

**Bakterieller Einfluss auf Autoimmunreaktionen bei
Rheumatoider Arthritis: Suche nach kreuzreaktiven Antikörpern
und Beitrag von Superantigenen bei induzierter Arthritis in der
Maus**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat)

**vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Dipl. Biologin Regine Wagner

geboren am 8. August 1976 in Wolfen

I Inhaltsverzeichnis

<i>I Inhaltsverzeichnis</i>	<i>I</i>
<i>II Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>III</i>
<i>1 Einleitung</i>	<i>1</i>
1.1 Rheumatoide Arthritis	1
1.1.1 Diagnose der Rheumatoiden Arthritis	1
1.1.2 Ätiologie und Verlauf der Rheumatoiden Arthritis	2
1.1.3 Bakterien und Viren in der Rheumatoiden Arthritis	3
1.2 Chlamydia trachomatis	5
1.2.1 Medizinische Bedeutung von <i>C. trachomatis</i>	5
1.2.2 <i>C. trachomatis</i> und Rheuma	6
1.3 Streptokokken	6
1.3.1 Krankheitsbilder der Streptokokken	7
1.3.2 M-Proteine	8
1.4 Hitzeschockproteine (HSP)	10
1.4.1 HSP in der Immunantwort	10
1.4.2 HSP und Rheumatoide Arthritis	11
1.5 Superantigene	12
1.5.1 Stimulation des Immunsystems	13
1.5.2 Superantigene und Rheumatoide Arthritis	14
1.6 Zielstellung	15
<i>2 Material und Methoden</i>	<i>17</i>
2.1 Material	17
2.1.1 Geräte	17
2.1.2 Kommerzielle Kits	17
2.1.3 Seren	18
2.1.4 Antikörper	18
2.1.5 Kulturmedien	18
2.2 Molekularbiologische Arbeitsmethoden	19
2.2.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	19
2.2.2 Primer	20
2.2.3 DNA-Sequenzierung	20
2.2.4 Klonierung	21
2.3 Reinigung von Proteinen	22
2.3.1 Affinitätschromatographie	22
2.3.2 Ionenaustauschchromatographie	22
2.4 Elektrophoretische und immunologische Arbeitsmethoden	23
2.4.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	23
2.4.2 Western-Blot-Analyse	24
2.4.3 Dot-Blot-Analyse	24
2.4.4 Enzyme-linked Immunosorbent-Assay (ELISA)	25
2.5 Tiere und Haltungsbedingungen	27
2.6 Lymphozyten-Transformationstest	27
2.6.1 Präparation von Th-Zellen	27
2.6.2 Proliferationstest	27
2.7 Antigen-induzierte Arthritis (AIA)	28
2.7.1 Immunisierung und Arthritisinduktion	28

2.7.2	Superantigenstimulation	28
2.7.3	Gelenkschwellung	28
2.7.4	Versuchsverlauf	29
2.7.5	Histologie	29
2.8	Statistische Auswertung	31
3	Ergebnisse	33
3.1	Induktion eines Arthritisschubes in der Maus durch Superantigengabe	33
3.1.1	Proliferationstest	33
3.1.2	Versuchsreihe I	34
3.1.3	Versuchsreihe II	37
3.1.4	Versuchsreihe III	39
3.1.5	Versuchsreihe IV	41
3.2	Antikörper gegen kreuzreaktive Strukturen	45
3.2.1	Nachweis kreuzreaktiver Antikörper gegen das Motiv DIMRLREKLQ aus Humanvimentin und aus dem M-Protein von Gruppe C-Streptokokken (MMC)	45
3.2.2	Nachweis von Antikörpern gegen bakterielles HSP60	56
4	Diskussion	63
4.1	Induktion von Arthritisschüben durch Superantigengabe in der Maus	63
4.1.1	<i>In vitro</i> Stimulation von Mauslymphozyten durch Superantigene	64
4.1.2	Mit geringen Konzentrationen verschiedener SAG und des MMC-Fragment ließ sich in Mäusen keine Arthritis reaktivieren	64
4.1.3	Durch die intraartikuläre Gabe von SPE-G war die Induktion eines Arthritisschubes möglich	65
4.2	Nachweis von Antikörpern gegen kreuzreaktive Strukturen	69
4.2.1	Kreuzreaktive Antikörper für Humanvimentin und das MMC-Protein von Gruppe G-Streptokokken	69
4.2.2	Antikörper gegen chlamydiales Hitzeschockprotein 60 in Seren von Rheumapatienten und Kontrollen	74
5	Zusammenfassung	81
6	Literaturverzeichnis	85
III	Danksagung	V
IV	Selbstständigkeitserklärung	VII
V	Curriculum Vitae	IX

II Abkürzungsverzeichnis

aa	amino acid Aminosäure
AIA	Antigen-induzierte Arthritis
APC	Antigen presenting cell Antigen-präsentierende Zelle
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
bp	Basenpaare
CD	Cluster of differentiation spezifische Antigene der Zelloberflächen
CIA	Collagen II induced arthritis Kollagen II induzierte Arthritis
CT	<i>Chlamydia trachomatis</i>
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FCS	foetal calf serum Fetales Kälberserum
GCS	Gruppe C Streptokokken
GAS	Gruppe A Streptokokken
GGs	Gruppe G Streptokokken
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HRP	Horse Radish Peroxidase Meerrettich Peroxidase
HSP	Hitzeschockprotein
i.a.	intraartikulär
i.v.	intravenös
IFN	Interferon
IL	Interleukin
kDa	Kilo Dalton
Kont.	Kontrollen
LTT	Lymphozyten Transformationstest
mBSA	methyalted bovine serum albumin methyliertes Rinderserumalbumin

MHC	M ajor h istocompatibility c omplex Haupthistokompatibilitätskomplex
MOMP	M ajor o uter m embrane p rotein Hauptmembranprotein
OD	O ptische D ichte
Pat.	Rheumap at ienten
RA	R heumatoide A rthritis
SAG	S uperantigen(e)
SCWIA	streptococcal c ell w all i nduced a rthritis Streptokokken-Zellwand-induzierte Arthritis
Sp.	S portler
TCR	T -cell r eceptor T-Zell-Rezeptor
TEMED	T etramethylethylen e diamine
TGF- β	transforming g rowth f actor β Transformierender Wachstums-Faktor β
TNF	T umornekrose f aktor

1 Einleitung

1.1 Rheumatoide Arthritis

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine Systemerkrankung mit autoimmunem Charakter. Die typischen chronischen Entzündungen mit Knorpel- und Knochendestruktionen sind dabei meist auf Finger-, Hand- und Fußgelenke konzentriert. Während Rheumaknoten an Sehnen bei ca. 20 % der Fälle auftreten, sind extraartikuläre Organmanifestationen an inneren Organen und den Augen selten, führen aber zu einer weiteren beträchtlichen Behinderung der Patienten. Der schubweise progrediente Verlauf führt durch Gelenkdestruktion oft zu stark verminderter Mobilität und Invalidität. Neben den durch den Krankheitsverlauf bedingten Einschränkungen müssen Patienten mit RA, unter anderem durch immunsuppressive Therapie, auch mit einer erhöhten Infektanfälligkeit rechnen (Cunnane *et al.*, 2003), die ebenfalls zu der Kostenintensität der Krankheit (Ruof *et al.*, 2003; Maezel *et al.*, 2004) beiträgt und die Lebensqualität der Betroffenen weiter reduziert.

1.1.1 Diagnose der Rheumatoiden Arthritis

Die Diagnose der RA erfolgt nach 1988 von der „American Rheumatism Association“ erarbeiteten Kriterien (siehe Tab.1). 4 der dort genannten Kriterien reichen aus um eine Rheumatoide Arthritis zu diagnostizieren, wobei die ersten 4 Kriterien über einen Zeitraum von 6 Wochen bestehen müssen.

Tab.1: Kriterien der Arthritis nach Arnett *et al.* (1988)

1.	Morgendliche Gelenksteifigkeit von mindestens einer Stunde
2.	vom Arzt festgestellte Arthritis (Weichteilschwellung oder Gelenkergüsse) an mindestens 3 Gelenken
3.	Befall mindestens eines Interphalangeagelenks, Metakarpophalagelenks oder Handgelenks
4.	Symmetrische Arthritis: gleichzeitiger Befall gleicher Regionen rechts und links
5.	Rheumaknoten durch einen Arzt festgestellt
6.	Nachweis des Rheumafaktors im Serum
7.	Röntgenveränderungen an Hand- oder Fingergelenken

Der Nachweis des Rheumafaktors ist bislang das einzige verwendete serologische Diagnoseverfahren. Als Rheumafaktoren werden IgM-Autoantikörper gegen den Fc-Teil des menschlichen Gammaglobulins (IgG) bezeichnet. Bei der Rheumadiagnose erfolgt der Nachweis solcher IgM-Antikörper. Diese Antikörper können jedoch nicht nur bei RA,

sondern auch im Verlauf von Infektionen, bei Kollagenosen oder sogar bei Gesunden auftreten (Lisse, 1993; Goldbach *et al.*, 2000; Palosuo, 2003). Eine höhere Spezifität des Testes kann durch das Heraufsetzen des „cut-off“ Wertes erreicht werden. Dies führt allerdings zu einem Sensibilitätsverlust des Testes, da besonders im Frühstadium Rheumatoider Arthritis hochtitrige Rheumafaktoren selten sind und nur bei 40 - 50 % der Betroffenen auftreten (Machold *et al.*, 2002). Dadurch wird eine Differenzialdiagnose gegen die Spondylarthropathien, wie Reaktive Arthritis und Morbus Reiter, erschwert. Wegen dieser unbefriedigenden Situation wurden in den letzten Jahren auch Antikörper gegen citrullinierte Antigene oder künstliche Peptide als neue RA-Marker untersucht. Ihre Spezifität scheint höher zu sein als beim klassischen Rheumafaktor (Steiner und Smolen, 2002).

1.1.2 Ätiologie und Verlauf der Rheumatoiden Arthritis

Die RA tritt bei ca. 1 % der Weltbevölkerung auf und ist verstärkt in den Industrienationen vertreten. Weibliche Personen sind 3 bis 4 mal häufiger betroffen als männliche.

Histologisch ist die Anfangsphase der RA durch unspezifische entzündliche Veränderungen der Synovialis mit Infiltration neutrophiler Granulozyten und mononukleärer Zellen, Hyperplasie der Synovialisdeckzellen, bei der es auch zu Riesenzellbildung kommen kann, und Gefäßproliferation gekennzeichnet. Im späteren Krankheitsverlauf besteht das entzündliche Infiltrat hauptsächlich aus Lymphozyten und Plasmazellen. Im Synovialis-Stroma kommt es zur mesenchymalen Proliferation, welche zur typischen Pannusbildung führt, dessen Folge wiederum Diffusionsstörungen, Arrosion und Destruktion von Knorpel und Knochen sind (Eder, 1990).

Bei dieser Entwicklung spielen vor allem die Th1-Zellen eine Rolle, die eine zelluläre Immunantwort vermitteln und die Proliferation stimulieren. Ihr dominierendes Auftreten in rheumatoider Synovialmembran wurde mehrfach nachgewiesen (Miltburg *et al.*, 1992; Adorini *et al.*, 1996), Ursache und Wirkung sind hierbei jedoch umstritten.

Die Ätiologie der RA ist immer noch unklar. In der Literatur werden bestimmte Allele verschiedener Gene im Zusammenhang mit einer genetischen Prädisposition diskutiert:

- HLA-Haupt-Histokompatibilitäts-Allele (Ronneld *et al.*, 1994; Zanelli *et al.*, 1995; Auger und Roudier, 1997)
- Fcγ-Rezeptor Typ 3A (Morgan *et al.*, 2000)
- Punktmutation im Interleukin-3 (Yamada *et al.*, 2001)
- CTLA4 (Zytotoxisches T-Lymphozyt Antigen 4) (Gonzalez-Escribano *et al.*, 1999)

- Vitamin D-Rezeptor (Garcia-Lozano *et al.*, 2001)
- TNF-Polymorphismus (Mulcahy *et al.*, 1996; Castro *et al.*, 2001; Meyer *et al.*, 2001; Waldron-Lynch *et al.*, 2001).

Neben einer genetischen Prägung sollen auch Umweltfaktoren, wie zum Beispiel Rauchen (Krishnan, 2003) bei der Entstehung der Rheumatoiden Arthritis eine Rolle spielen. Zunehmend werden aber auch vorangegangene oder persistierende mikrobielle Infektionen als mögliche Auslöser einer RA in Betracht gezogen. Für drei bakterielle Proteingruppen soll eine Beteiligung an der Entstehung Rheumatoider Arthritis in der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

1.1.3 Bakterien und Viren in der Rheumatoiden Arthritis

Verschiedene Konzepte wurden für eine mikrobielle Beteiligung bei der Entstehung der RA entwickelt. Das erste Modell geht von kontinuierlicher Antigenpräsentation im Gelenkgewebe aus, die in einer chronischen Synovitis resultiert. Hierbei spielen besonders Erreger gastrointestinaler Infekte wie *Yersinia*, *Salmonella*, *Shigella* und *Campylobacter*, aber auch *Chlamydia* eine Rolle. Verschiedene als Antigen wirkende mikrobielle Abbauprodukte konnten in der Synovialflüssigkeit nachgewiesen werden, in einigen Fällen gelang auch der Nachweis von bakterieller DNA (Wilkinson *et al.*, 1999) und 16sRNA (Cox *et al.*, 2003). 1994 konnten Eerola *et al.* zeigen, dass Patienten mit frischer RA-Diagnose eine von gesunden Kontrollen abweichende intestinale Flora aufweisen. Es ist bekannt, dass neben der Ernährung jedoch auch die genetische Veranlagung entscheidend für die mikrobielle Flora eines Menschen ist (Hoeksma und Winkler, 1963; van de Merwe *et al.*, 1983).

In den meisten Untersuchungen wird allerdings der autoimmune Charakter der Erkrankung in den Mittelpunkt gestellt. Ähnliche Sequenzen von Pathogen und Wirtsorganismus, die zu kreuzreaktiven Antikörpern führen könnten, werden biochemischen und immunologischen Analysen unterzogen (Ebringer *et al.*, 1997). Für einige pathogene Organismen wurden bereits kreuzreaktive Sequenzepitope beschrieben:

- Für das Epstein-Barr-Virus wurde neben einem erhöhten Antikörperspiegel in RA-Patienten (Alspaugh *et al.*, 1981) im Glykoprotein gp110 mit QRRAA eine Sequenzhomologie zu der QKRAA-Sequenz auf dem RA-assoziierten HLA-DRB1 Allel nachgewiesen (Roudier *et al.*, 1988).
- *Proteus mirabilis* weist im Hämolysin ein Motiv (ESRRAL) auf, dessen Antikörper mit einem Sequenzabschnitt (EQKRAA) an Fibroblasten kreuzreagieren (Tiwana *et*

al., 1999), auch hier konnten bei Patienten mit RA erhöhte IgG-Titer gemessen werden (Blankenberg-Sprengel *et al.*, 1998; Senior *et al.*, 1999).

- Im *Chlamydia trachomatis* Sigma-Faktor wurden kreuzreaktive Antikörper induzierende Sequenzhomologien zum humanen Protein L7 nachgewiesen (Hemmerich *et al.*, 1998).

Weiterhin sind auch Kreuzreaktionen von Antikörpern gegen das Knorpelprotein Vimentin und Streptokokken M-Protein beschrieben (Kraus *et al.*, 1989; Baird *et al.*, 1991; Geyer *et al.*, 1999), wobei durch die Arbeit von Geyer *et al.* (1999) auch eine Sequenzhomologie aufgedeckt wurde. Vimentin scheint bei der RA eine gewisse Rolle zu spielen, so ist nicht nur eine höhere Vimentinexpression in Fibroblasten aus entzündetem Panusgewebe (Ritchlin *et al.*, 1994; Xue *et al.*, 1997), sondern auch ein erhöhter Autoantikörpertiter gegen, unter anderem, Vimentin bei RA (Osung *et al.*, 1982) nachgewiesen wurden. Der Befund erhöhter Autoantikörper gegen Vimentin konnte im Tiermodell der Ratte bestätigt werden (Franch *et al.*, 1994).

Eine erhöhte Präsentation von Autoantigenen wird auch bei der Entwicklung von Kreuzreaktionen auf Hitzeschockproteine (HSP) postuliert (siehe auch im Abschnitt Hitzeschockproteine). HSP werden während einer Infektion sowohl vom Wirt (Diedrich *et al.*, 1993) als auch vom Pathogen (Kaufmann, 1990) verstärkt produziert und bieten sich mit ihrer evolutionär hochgradig konservierten Struktur für Kreuzreaktionen geradezu an. Allerdings ist die Rolle der HSP bei Autoimmunerkrankungen noch unklar und wird kontrovers diskutiert.

Von Bakterien und Viren produzierte Superantigene reagieren mit dem Immunsystem in einer unkonventionellen Art, die zu einer polyklonalen Aktivierung von bis zu 20 % einer CD4⁺ T-Zellpopulation führt (siehe auch im Abschnitt Superantigene). Diese relativ unspezifische T-Zellstimulation könnte eine verstärkte Produktion autoreaktiver T-Zellen auslösen, welche nachfolgend entzündliche Prozesse hervorrufen und so an der Entstehung rheumatischer Erkrankungen beteiligt sein können.

Verschiedene Gruppen untersuchten außerdem die Beteiligung des humanen Parvovirus B19 (Ishii *et al.*, 1999; Meyer, 2003), von *Borrelia burgdorferi* (Kuryliszyn-Moskal, 2002) und von Retroviren (Hasunuma *et al.*, 1998; Griffiths *et al.*, 1999) an der Rheumatoiden Arthritis.

1.2 *Chlamydia trachomatis*

Neben *Chlamydia trachomatis* gehören zu den Chlamydiaceae zwei weitere human-pathogene Arten: *C. pneumoniae* und *C. psittaci*. Die Chlamydiaceae besitzen eine gramnegative Zellwand mit Lipopolysacchariden. Das Besondere dieser Bakteriengruppe ist das Hauptmembranprotein (MOMP, Major outer membrane protein), welches sich in der peptidoglykanlosen Zellwand befindet. Die Chlamydiaceae sind eine Familie obligat intrazellulärer Bakterien, die als „Energieparasiten“ auf die ATP-Synthese ihres Wirtes angewiesen sind. Sie durchlaufen während ihrer Vermehrung zwei Entwicklungszyklen. Elementarkörper (EK) sind das 0,3 µm große, optisch dichte, extrazelluläre und infektiöse Stadium dieser Bakterien, die über Anlagerung an die Microvilli durch Endo- oder Phagozytose aktiv in die Zelle eingebracht werden. Hier verbleiben sie im Phagosom und wandeln sich zu Retikularkörpern (RK) um. Die 1,0 µm großen Retikular- oder Initialkörper bilden das vermehrungsfähige Stadium der Chlamydien. Nachdem die Vermehrung abgeschlossen ist, folgt die Reorganisation der Bakterien zu Elementarkörperchen, bevor es zur Lyse der Zelle und Freisetzung der Chlamydien kommt (Kayser *et al.*, 1998). Die durch Immunreaktionen des Körpers bedingte Ausschüttung von TNF- α , TNF- β und IFN- γ kann über den damit verbundenen Anstieg der Indolaminoxigenase allerdings zu einer Verlangsamung des Chlamydienzyklusses führen (Carlin *et al.*, 1989). In Folge dieser Verlangsamung kann es auch zu einer Persistenz der Chlamydien im Wirtsorganismus kommen.

1.2.1 Medizinische Bedeutung von *C. trachomatis*

C. trachomatis wird in Serogruppen mit den Buchstaben A-L eingeteilt. Verschiedene Serogruppen lassen sich bestimmten Krankheitsbildern zuordnen. So sind die Serogruppen A, B und C für die Verursachung des, besonders in tropischen Ländern auftretenden und dort durch chronische und wiederholte Infektionen zur Erblindung führenden, Trachoms verantwortlich. Auch das Lymphogranuloma venerum, verursacht durch Serogruppe L (mit Unterteilung der Serovare L₁-L₃), ist hauptsächlich in warmen Klimazonen zu finden. Bei den meisten in Deutschland anzutreffenden *C. trachomatis* Infektionen handelt es sich um Infektionen mit den Serogruppen D-K, welche Schleimhäute des Urogenitaltrakts, der Augen und des Respirationstrakts besiedeln können. Eine durch Schmierinfektionen (Schwimmbadkonjunktivitis) oder bei der Geburt von der urogenital infizierten Mutter auf das Kind übertragene Konjunktivitis verläuft meist gutartig und wesentlich milder als das Trachom.

Auch Neugeborenen-Pneumonien, die ebenfalls von der Mutter auf das Kind übertragen werden, heilen meist folgenlos aus. Probleme bereiten nur Urogenitalinfekte, die zumindest bei weiblichen Personen häufig unbemerkt verlaufen, oft chronisch werden und zur Sterilität führen können (Cates *et al.*, 1990; Paavonen, 1998). Als weitere Folgekrankheiten sind Morbus Reiter und Reaktive Arthritis bekannt, wodurch *C. trachomatis* auch als möglicher Auslöser für Rheumatoide Arthritis an Interesse gewinnt.

1.2.2 *C. trachomatis* und Rheuma

Neben den bereits oben erwähnten Sequenzhomologien zwischen dem humanen Protein L7 und dem *C. trachomatis* Sigma-Faktor, scheint bei dem Übergang von einer reaktiven Chlamydien-Arthritis zu einer chronisch RA die genetische Prägung des Wirts eine Rolle zu spielen. So konnte in Patienten mit Chlamydien-bedingter Reaktiver Arthritis in Abhängigkeit vom Vorhandensein des HLA-B27 Alleles nicht nur eine Korrelation zum synovialen IFN- γ Level, der in HLA-B27-positiven Patienten niedriger war als in HLA-B27-negativen Patienten, hergestellt werden, sondern auch zum weiteren Krankheitsverlauf. Während alle untersuchten HLA-B27-negativen Patienten sich von ihrer Krankheit erholten, konnte bei HLA-BL27-positiven Patienten ein dramatischerer Krankheitsverlauf und in einigen Fällen sogar ein Übergang in eine chronische Arthritis beobachtet werden (Bas *et al.*, 2003).

Auch die differenzierte Expression von *C. trachomatis* hsp60 Genen scheint bei der Entstehung von Persistenz und der damit möglichen Arthritisinduktion involviert zu sein. In Zellkulturen mit einer aktiven *C. trachomatis* Infektion wurden überwiegend Transkripte von *ct110* (*groEL1*) und *ct604* (*groEL2*) gefunden, während in persistent infizierten Zellkulturen Transkripte des *ct755* (*groEL3*) Genes überwogen (Gerard *et al.*, 2004).

1.3 Streptokokken

Die Gattung *Streptococcus* umfasst eine große Gruppe grampositiver, sich in Ketten oder Paaren anordnender unbeweglicher, katalasenegativer, fakultativ anaerober Kokken. Ihre Einteilung erfolgt nach ihrem Hämolysevermögen in α - (sogenannte vergrünende), β - und γ - (nicht hämolysierende) Streptokokken und der Antigenstruktur (Lancefield, 1933). Grundlage der Lancefield-Gruppierung, mit der sich wenigstens 24 Gruppen (A-Z, ohne I und J) unterscheiden lassen, ist die Antigenität eines polymeren Kohlenhydrates in der Zellwand. Eine Ausnahme bildet das Antigen D, welches eine Lipoteichonsäure ist. Dieses Antigen

besitzen auch die Enterokokken, die früher zusammen mit den Streptokokken einen gemeinsamen Genus bildeten.

1.3.1 Krankheitsbilder der Streptokokken

Von medizinischer Bedeutung sind insbesondere die β -hämolysierenden Streptokokken der Gruppe A (GAS), B (GBS), C (GCS) und G (GGS) sowie die α -hämolysierenden Pneumokokken, die sich nicht eindeutig einer Lancefieldgruppe zuordnen lassen.

Für ca. 90% der Streptokokken-Erkrankungen ist *Streptococcus pyogenes* (GAS) verantwortlich. Dieser Keim verursacht sowohl nicht-invasive Erkrankungen wie Pharyngitis, Otitis media, Scharlach, Tonsillitis als auch invasive Infekte, zu denen Wundinfektionen, Meningitis, Pneumonie, Peritonitis, septische Arthritis, Osteomyelitis, Zellulitis, nekrotisierende Faszitis, Bakteriämie, Sepsis und auch der gefürchtete toxische Schock gehören. *S. pyogenes* ist auch als Auslöser nichteitriger Folgeerkrankungen bekannt. Nach Infektionen des oberen Respirationstraktes kann es zu einem akuten rheumatischen Fieber (ARF) mit Entzündungen der Gelenke und des Herzens kommen. Die akute Glomerulonephritis (AGN) kann dagegen sowohl nach Haut- als auch nach Racheninfektionen auftreten.

Streptococcus agalactiae (GBS) verursacht nur gelegentlich bei abwehrgeschwächten Personen Infektionen und ist hauptsächlich als Auslöser der Neonatalen Sepsis bekannt. Außerdem werden sie oft bei Rindern als häufigster Erreger der Mastitis gefunden.

Streptokokken der Gruppen C und G werden ebenfalls häufig von Tieren isoliert, können aber auch schwere eitrige Infekte beim Menschen verursachen (Mohr *et al.*, 1979; Barson, 1986; Bisno *et al.*, 1996) und wurden sogar mit dem toxischen Schocksyndrom in Verbindung gebracht (Keiser und Campbell, 1992; Roth *et al.*, 1999).

Wie *S. pyogenes* treten auch die Pneumokokken (*S. pneumoniae*) als symptomlose Infektionen auf. Ca. 40-70% der gesunden Erwachsenen sind Träger von *S. pneumoniae*. Von Pneumokokken ausgelöste Erkrankungen wie Lobärpneumonie, Bronchopneumonie, Otitis media, Sinusitis und Meningitis sind daher meist endogenen Ursprungs.

Die Streptokokken besitzen eine Reihe von Pathogenitätsfaktoren (siehe Tab.2), wobei Oberflächenkomponenten und extrazelluläre Produkte unterschieden werden.

Die für diese Arbeit wichtigsten Pathogenitätsfaktoren sind die pyrogenen Exotoxine, auf die im Abschnitt Superantigene genauer eingegangen wird, und das M-Protein, welches bei Gruppe A-Streptokokken und auch bei Gruppe C- und G-Streptokokken gefunden wurde (Geyer *et al.*, 1999).

Tab.2: Pathogenitätsfaktoren der GAS

Faktoren	Effekte
Oberflächenkomponenten	
Serumopazitätsfaktor OF	Adhäsion, binden Fibronektin
Protein F	
Lipoteichonsäuren	
Peptidoglykan-Polysaccharid-Komplex	gewebstoxisch
Hyaluronsäurekapsel	antiphagozytär
M-Protein	
C5a-Peptidase	verhindert Aktivierung der Granulozyten
Sekretorische Proteine	
Streptokinase	Verbreitung im Gewebe
Hyaluronidase	Gewebszerstörung
Proteinase	
Streptokokken Dnasen	Invasivität
Streptolysin O und S	Membranzerstörung
pyrogene Exotoxine (Superantigene)	Immunotoxine

1.3.2 M-Proteine

M-Proteine sind aufgrund ihrer antiphagozytären Wirkung wichtige Virulenzfaktoren der Streptokokken. Die antiphagozytäre Wirkung dieser Proteine lässt sich hauptsächlich auf ein Eingreifen in die alternative Komplementaktivierung zurückführen. Ähnlich den Wirtszelloberflächen sind sie in der Lage Serumfaktor H zu binden, welcher die Komplementfaktoren Bp und C3b voneinander trennt und anschließend eine Inaktivierung von C3b durch Spaltung mittels Plasmaproteasefaktor I ermöglicht. Dies führt zu einer Reduzierung der C3b-Moleküle auf der Streptokokkenoberfläche, wodurch eine C3b aktivierte Phagozytose unterbunden wird (Horstmann *et al.*, 1988; Perez-Casal *et al.*, 1995). Auch durch die Bindung von Fibrinogen wird die Anlagerung von BpC3b-Komplexen auf den Bakterien unterbunden (Whitenack *et al.*, 1984). Einige M-Proteine, wie zum Beispiel M3 (Schmidt *et al.*, 1993), sind in der Lage, Fibronektin zu binden, was eine Bindung der Streptokokken an Epithelzellen fördert und so zur Ausbreitung der Bakterien im Organismus beiträgt.

Es handelt sich bei den M-Proteinen um fibrilläre Zellwandproteine, welche mit ihrem C-terminalen Ende in der Zellwand verankert sind und deren N-terminaler Teil nach außen gerichtet ist. Die N-terminale Region ist äußerst variabel und trägt zur Typenvielfalt der Streptokokken bei. Der C-Terminus des Proteins, welcher auch als Bindestelle für den oben erwähnten Serumfaktor H dient, ist hingegen hoch konserviert. Nach ihrer Reaktionsfähigkeit mit Antikörpern gegen die C-Repeatregion (wie zum Beispiel anti-M MAb 10B6) werden M-Proteine in Klasse I und Klasse II Moleküle unterteilt. Studien ergaben eine Korrelation

zwischen M-Proteinen mit dem Klasse I Epitop und dem Auftreten von Rheumatischem Fieber (Bessen *et al.*, 1989). Zwischen dem N- und C-Terminus verlaufen drei Repeatregionen (A, B, C). Über einen großen Teil des Moleküls erstreckt sich eine typische α -helikale coiled-coil Struktur, die durch sich periodisch wiederholende Einheiten von 7 Aminosäuren gekennzeichnet ist, wobei jeweils die erste und die vierte Aminosäure hydrophob wirken und so das Gerüst für die coiled-coil Struktur bilden. Die nötige thermodynamische Stabilität wird durch das Ausbilden von Dimeren gewährleistet.

Dem M-Protein ähnliche coiled-coil Strukturen sind in Säugerproteinen häufig vertreten (Kaplan und Meyesian, 1962), während sie als bakterielle Oberflächenproteine selten zu finden sind (Robinson und Kehoe, 1992). Diese strukturellen Homologien von Wirts- und Pathogenproteinen können zur Bildung von kreuzreaktiven Antikörpern führen. Derartige kreuzreaktive Epitope sind für Myosin sowohl in der C- (Quinn *et al.*, 1998) als auch in der N-Repeatregion der M-Proteine (Cunningham *et al.*, 1989) und für Nierenglomeruli (Kraus und Beachery, 1988) identifiziert worden. Ein mit Vimentinepitopen kreuzreagierendes M-Protein von Gruppe C-Streptokokken (MMC-Protein) wurde von Geyer *et al.* 2000 beschrieben (siehe Abb.1).

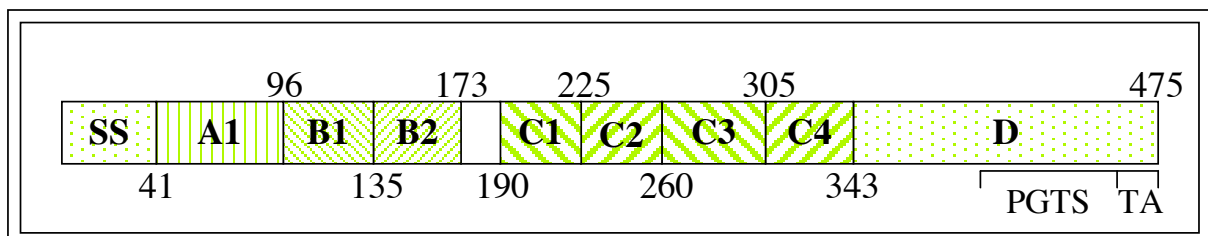


Abb.1: Schematische Darstellung des M-Proteins von Gruppe C Streptokokken (Stamm 25286, *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*) (nach Geyer *et al.*, 2000).
 SS: Signalsequenz; A, B, C, D: Sequenzrepeatblöcke; PGTS: Prolin-Glycin-Threonin-Serin reiche Region; TA: Transmembranankerregion; Zahlenangaben: erste, bzw. letzte Aminosäure der Repeatsequenz.

In diesem Protein konnten 3 sich wiederholende, in Heptadeinheiten passende Sequenzen identifiziert werden, deren Strukturen mit der humanen Vimentinsequenz (Accession number X56134) in den Aminosäuren 181-190 übereinstimmen (siehe Tab.3); auch kreuzreaktive Antikörper waren für diese Strukturen nachweisbar.

Tab.3: Alignment homologer Regionen von Humanvimentin und MMC-Protein

DIMRLREKLQ	-----	Vimentinmotiv aa 181-190
:	: : : :	
DSDILKEKLS	-----	MMC Motiv aa 68-77, A-Region
:	: : : : :	
DISDLKEKLQ	-----	MMC Motiv aa 96-105 B-Repeat B1
:	: : : : :	
DISDIKEKLQ	-----	MMC Motiv aa 135-144, B-Repeat B2

Zusätzlich zur Sequenz sind auch die Positionen der Heptadeinheiten in der Aminosäuresequenz der Proteine angegeben.

1.4 Hitzeschockproteine (HSP)

Hitzeschockproteine sind Proteine, denen eine wichtige Rolle in der Proteinfaltung und dem Proteintransport zukommt (Welch, 1993). Unter Stress, wie zum Beispiel Hitze, erhöht sich ihre Syntheserate dramatisch (Linguist, 1981; Li und Laszlo, 1985). HSP gehören zu den höchst konservierten Proteinen und sind in allen bekannten Organismen zu finden. Unter erhöhten Temperaturbedingungen reagieren alle Lebewesen mit der Produktion von Proteinen, welche von der hsp70 und hsp90 Genfamilie codiert werden (Linguist, 1981; Li und Laszlo, 1985). Neben hsp70 und hsp90 gehören auch hsp60 (groEL) und eine Reihe kleinerer HSP, die in ihrer Größe von 16 kD in *Caenorhabditis elegans* (Rusznak und Candido, 1985) bis zu 40 kD in *Schistosoma mansoni* (Nene et. al., 1986) reichen, in diese Familie.

1.4.1 HSP in der Immunantwort

HSP sind starke, äußerst effektive Antigene bei Infektionen mit den verschiedensten Pathogenen. Eine der ersten Untersuchungen zu diesem Thema war die Identifikation hsp60-spezifischer CD4⁺T-Zellklone von Leprapatienten (Emmrich *et al.*, 1986). Aus gesunden Personen konnten ebenfalls HSP-Antikörper isoliert werden, was dafür spricht, dass HSP-Immunantworten schon bei Kontakt mit gering virulenten Mikroorganismen, die nur für eine kurze Zeit im Wirt überleben können, ausgelöst werden, ohne dass es zu klinischen Symptomen kommt (Munk *et al.*, 1988).

Antikörper und T-Zellen, welche auf HSP reagieren, werden allerdings nicht nur gegen mikrobielle Invasoren gebildet. Auch in nicht infizierten Individuen können Antikörper und T-Zellen gefunden werden, die gegen humane HSP gerichtet sind und der Identifikation und Eliminierung abweichender Zellen dienen (Srivastava und Maki, 1991; Marrack und Kapplars, 1993).

In den Seren von Malariapatienten konnten Antikörper, welche sowohl mit hsp70 von *Plasmodium falciparum* als auch mit humanen Strukturen reagieren, isoliert werden (Mattei *et al.*, 1988). Gleiches gilt für Leprapatienten, bei denen Antikörper, die sowohl mykobakterielles als auch humanes von Nerven exprimiertes hsp60 erkennen (Launois *et al.*, 1992) und T-Zellen, die mit hsp70 von *M. leprae* und mit humanem hsp70 reagieren (Ford *et al.*, 1993), gefunden wurden.

1.4.2 HSP und Rheumatoide Arthritis

Bei der Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis wird Hitzeschockproteinen und der durch sie ausgelösten Immunantwort eine Bedeutung zugeschrieben. Denn es konnte nachgewiesen werden, dass Zellen der synovialen Deckzellschicht von Patienten mit RA oder Juveniler chronischer Arthritis (JCA) verstärkt eigen-hsp60 exprimieren (Boog *et al.*, 1992).

Die Rolle der Hitzeschockproteine bzw. der gegen eigen-hsp gerichteten Immunantwort scheint jedoch eine den Krankheitsverlauf positiv beeinflussende zu sein. In Patienten mit spontan ausheilender JCA konnte bei hsp60-reaktiven T-Zellen die Produktion von IL-4 und TGF- β sowie die Überexpression von CD30 stimuliert werden. Dies entspricht einer Th2-Typ Immunantwort, während rheumatoides Gewebes gewöhnlich ein klassisches Th1-Profil zeigt. Deshalb wurde diese Th2-Typ Antwort als mögliche Ursache der Krankheitsremission in Betracht gezogen (de Graeff-Meeder *et al.*, 1995; Prakken *et al.*, 1996). In Tiermodellen wurden Ratten mit verschiedenen mykobakteriellen hsp60 (Mhsp60) Epitopen immunisiert. Das Ergebnis dieser Immunisierungsversuche war, dass nur Epitope, die in konservierten Regionen zu finden waren und eine hohe Homologie zu Ratten-hsp60 aufwiesen, in der Lage waren, die Entwicklung einer experimentellen Arthritis zu verhindern (Anderton *et al.*, 1995). Van Eden *et al.* (1988) untersuchten die gegen *M. tuberculosis* gerichtete T-Zelllinie A2. Zwei Subklone dieser Zelllinie, A2b und A2c, welche beide vom CD4 Typ sind, erkennen ein gemeinsames Epitop im mykobakteriellen hsp60 (180-188) und haben aufgrund unterschiedlicher INF- γ Produktion im Fall von A2b einen arthritisinduzierenden (van Eden *et al.*, 1988) und im Falle von A2c einen vor Arthritis schützenden Effekt (van Eden *et al.*, 1991). Das von diesen T-Zellen erkannte Peptid (TFGLQLELT) kommt nicht in einer konservierten Region des Mhsp60 vor und kreuzreagiert auch nicht mit Säuger-hsp60, sondern mit einem Epitop in Knorpelproteoglykanen (Cohen, 1992). Auch das Mhsp60-Peptid 180-188 selbst ist bei nasaler Applikation in der Lage, mit nur einer einzigen veränderten Aminosäure (Alanin in Position 183) einen Arthritischutz anstelle einer Arthritisinduktion zu vermitteln (Feige *et al.*, 1996; Prakken *et al.*, 1997).

Diese sehr widersprüchlichen Befunde lassen eine abschließende Interpretation der Wirkung von HSP nicht zu.

1.5 Superantigene

Bei Superantigenen (SAG) handelt es sich um mikrobielle Toxine, welche in der Lage sind, sich an die äußere α -Kette von MHC II-Rezeptoren antigenpräsentierender Zellen (APC) anzulagern. Der antigenbindende Bereich der MHC-Rezeptoren wird dabei umgangen (Dellabonda *et al.*, 1990). Nachfolgend bindet der entstandene MHC-SAG-Komplex über ein geeignetes SAG-Epitop an T-Zellrezeptoren (TCR) auf CD4⁺T-Zellen (siehe Abb.2). Meist erfolgt diese Bindung über die V β -Ketten des TCR (Kappler *et al.*, 1990), wobei jedes SAG nur an bestimmte V β -Typen binden kann. 25 solcher V β -Elemente werden nach ihren Sequenzen beim Menschen unterschieden. Einige Ausnahmen, wie zum Beispiel SPE-C (Li *et al.*, 1997) oder SPE-J (Proft *et al.*, 2001), binden an die V α -Kette des TCRs. Über diesen Bindungsmechanismus wird die klassische Antigenpräsentation über Peptide ausgeschaltet.

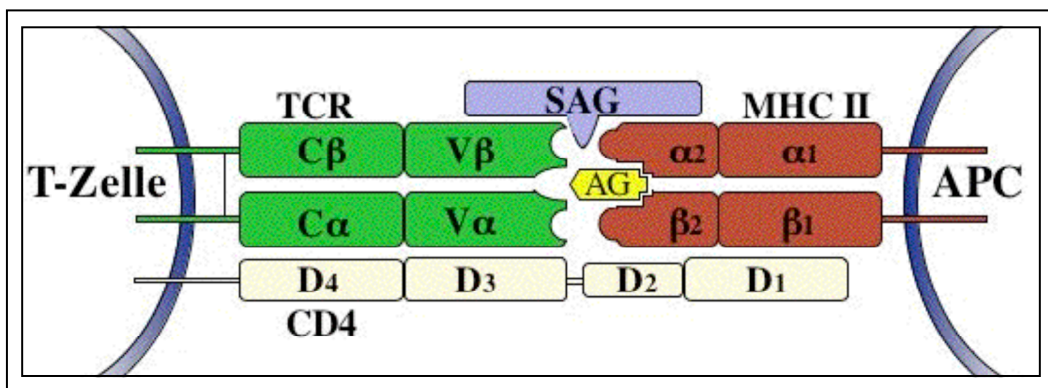


Abb.2: Bindung eines MHC II-Rezeptors auf einer Antigenpräsentierenden Zelle an einen T-Zell-Rezeptor auf einer CD4⁺T-Zelle über ein Superantigen. Zeitgleich präsentiert der MHC II Rezeptor ein konventionelles Antigen (AG), welches aber nicht in der Lage wäre, eine Bindung zum T-Zell-Rezeptor herzustellen.

Zu den am besten charakterisierten SAG gehören neben den Enterotoxinen von *Staphylococcus aureus* die pyrogenen Exotoxine der Streptokokken (SPE). *S. aureus* bildet außer den Enterotoxinen noch das Toxische-Schock-Syndrom-Toxin (TSST) und die Exfoliativen Toxine. Alle diese Superantigene weisen hohe Sequenzhomologien (20% - 90%) und große strukturelle Ähnlichkeiten zu den pyrogenen und mitogenen Exotoxinen der Streptokokken (SPE und SME) auf, was einen gemeinsamen Ursprung nahe legt. Viele dieser Toxine sind phagenkodiert. Von der relativ homologen Struktur dieser Superantigene grampositiver Bakterien unterscheiden sich das *Mycoplasma arthritidis* Mitogen (MAM) (Cole und Atkin, 1991) und das *Yersinia pseudotuberculosis* Mitogen (YPM) (Ito *et al.*, 1995).

ebenso deutlich, wie das Superantigen des Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV) (Acha-Orbea und MacDonald, 1995). Weitere Superantigene werden im Cytomegalievirus (CMV), HIV und Epstein-Barr-Virus (EBV) und sogar in Parasiten wie *Plasmodium falciparum* vermutet.

1.5.1 Stimulation des Immunsystems

Superantigene sind in der Lage, ohne eine Prozessierung MHC II-tragende APC (zum Beispiel Makrophagen und B-Zellen) mit TCR von T-Zellen zu verbinden. Das führt zu Aktivierung einer großen Anzahl von CD4⁺T-Zellen. Die Bindung von Superantigenen an TCR ist nicht auf ein bestimmtes Epitop in der hypervariablen Region des Rezeptors angewiesen, sondern wird nur durch das im Rezeptor exprimierte V β -Segment limitiert, wodurch sie bis zu 20% einer CD4⁺T-Zellpopulation zur Proliferation und Freisetzung inflammatorischer Zytokine (z.B.: INF- γ , TNF- α) stimulieren können, was gegenüber der Aktivierung mit spezifischen Antigenen, welche nur mit einer von 10.000 bis 1.000.000 T-Zellen reagieren können, eine beträchtliche Steigerung ist. Hinzu kommt, dass von aktivierten T-Zellen sezerniertes INF- γ zu einer Stimulierung der MHC II-Expression auf APC führt, was die Anzahl der Rezeptoren für Superantigene erhöht und die Produktion weiterer Immunmediatoren fördert (Ting und Baldwin, 1993) (siehe Abb.3). 4-5 Tage nach einer solchen Aktivierung kommt es jedoch zu einer Erschöpfung jener CD4⁺T –Zellen, an deren V β -Region das Superantigen binden konnte (White *et al.*, 1989; Kawabe and Ochi, 1991).

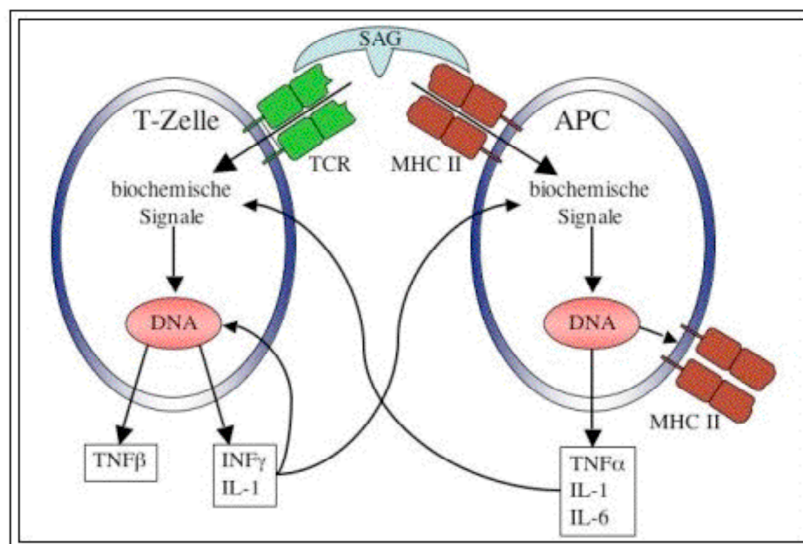


Abb.3: Interaktion der von T-Zellen und APC ausgeschütteten Zytokine nach Kotb 1995

Superantigene sind mit ihrem schwerwiegenden Eingriff in das Immunsystem potentielle Verursacher einer Reihe von Erkrankungen. Bei bestimmten Arten der Lebensmittelvergiftung konnten die pyrogenen Enterotoxine der Staphylokokken (SEs) bereits eindeutig als Auslöser identifiziert werden (Bergdoll, 1985). Gleiches gilt für das Toxische-Schock-Syndrom. Diese durch SEs und SPEs verursachte Erkrankung ist gekennzeichnet durch Gewebsinvasion und Bakteriämie. Häufig kommt es zum Schock, nekrotisierender Faszitis und/oder Multiorganversagen, so dass trotz Antibiotikaeinsatz und intensivmedizinischer Betreuung die Letalität einer solchen Infektion bei bis zu 30% liegt.

Superantigene werden aber auch mit Autoimmunerkrankungen wie Asthma (Herz *et al.*, 1999), Diabetis mellitus (Conrad *et al.*, 1997), Arthritis (Cole und Griffiths, 1993), Multiple Sklerose (Schiffenbauer *et al.*, 1993), Akutes Rheumatisches Fieber (ARF) (Kotzin *et al.*, 1993) und der Kawasaki Krankheit (Yarwood *et al.*, 2000) in Verbindung gebracht. Selbst bei AIDS wird eine Beeinflussung des Krankheitsbildes durch Superantigene vermutet und untersucht (Torres *et al.*, 1996).

1.5.2 Superantigene und Rheumatoide Arthritis

Für eine Beteiligung von Superantigenen an der Entstehung der RA sprechen die Ergebnisse verschiedener Studien. T-Zellen, die CD4-Rezeptor-tragenden Zielzellen der SAG spielen bei der Initiierung und Erhaltung der chronischen Entzündungen während einer RA eine entscheidende Rolle (Panayi *et al.*, 1992). Auch bei verschiedenen Arthritistiermodellen, wie dem hier angewandten Antigen-induzierten Arthritismodell (AIA) (siehe Abschnitt 4.7), wurde eine Abhängigkeit der Erkrankung von CD4⁺-Zellen nachgewiesen (Pohlers *et al.*, 2004). Des weiteren wurde die primäre T-Zellantwort auf Staphylokokken Enterotoxin B als typische Arthritis-assoziierte Th1-Antwort mit einer dominierenden Expression von IL-2, TNF- α und IFN- γ , gegenüber einer niedrigen IL-10 Expression, beschrieben (Hermann *et al.*, 1992; Miethke *et al.*, 1992; Litton *et al.*, 1994). MHC II-exprimierende Synovialfibroblasten wurden auch als die Zielzellen Superantigen aktivierter zytotoxischer T-Zellen identifiziert (Kraft *et al.*, 1998). Bei Ratten, die intravenös mit *Staphylococcus aureus* infiziert wurden entwickelten fast alle die einen Superantigen-produzierenden Stamm erhalten hatten, eine Arthritis. Nur bei ca. 20% der Ratten ohne Superantigen produzierenden Stamm wurde eine Arthritis beobachtet, welche aber stets einen mildereren Verlauf nahm als in Superantigen-assoziierten Fällen (Bremell und Tarkowski, 1995). Sowohl mit dem TSST-1 (Kageyama *et al.*, 2001) als auch mit *Mycoplasma arthritidis* Superantigen (MAM) (Cole and Griffiths,

1993) konnten im Collagen-induzierten Arthritismodell (CIA) eine Verstärkung bzw. ein Auslösen einer Arthritis erreicht werden.

Allerdings gibt es auch bei den SAG, ähnlich den HSP, Studien, die auf einen durch Superantigen vermittelten Schutz vor Autoimmunerkrankungen hindeuten. In der CIA konnte durch eine der Collagengabe vorangegangene SEB-Behandlung ein Schutz vor Arthritis erreicht werden, was möglicherweise auf die einer Superantigenstimulation folgende T-Zell-Erschöpfung zurückzuführen ist (Kummar *et al.*, 1997).

1.6 Zielstellung

Bei bakteriellen Infektionen interessieren nicht mehr nur die akuten, dank Antibiotika oft leicht zu behandelnden Phasen. Zunehmend werden sie auch mit der Entstehung chronischer Krankheitsbilder in Zusammenhang gebracht. So wird zum Beispiel *Helicobacter pylori* mit Magenkrebs (Asaka *et al.*, 1998), *Chlamydia pneumoniae* mit koronaren Herzkrankheiten (Ellis, 1997) und Alzheimer (Little *et al.*, 2004) in Verbindung gebracht. Auch die Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis wird vermutlich durch Bakterien beeinflusst.

Die Bildung kreuzreaktiver Antikörper wird als ein möglicher Beitrag von Bakterien zur Entstehung chronischer Arthritiden diskutiert (Ebringer 1997). Dabei wird davon ausgegangen, dass der Wirtsorganismus gegen bakterielle Antigene Antikörper bildet, die auch mit körpereigenen Strukturen reagieren können und das entsprechende Gewebe schädigen. Antigene Strukturen, die zur Ausbildung kreuzreaktiver Antikörper führen können, wurden unter anderem bei Chlamydien und Streptokokken identifiziert. So reagieren Antikörper gegen das M-Protein von Gruppe C-Streptokokken auch mit dem humanen Knorpelprotein Vimentin (Geyer *et al.*, 1999). Ein weiterer Angriffspunkt für kreuzreaktive Autoimmunreaktionen sind, wegen ihrer evolutionären Konserviertheit, die Hitzeschockproteine. Sollten kreuzreagierende Antikörper oder Antikörper gegen hochkonservierte oder homologe Proteinstrukturen an der Entstehung der Rheumatoiden Arthritis beteiligt sein, sollten sie in Seren von Rheumapatienten häufiger als in den Seren von rheumafreien Kontrollen auftreten.

Die RA ist eine Erkrankung, bei der zwischen Ruhephasen auch Krankheitsschübe auftreten. Die Ursache dieser Schübe ist noch unklar, bakterielle Infektionen könnten dabei aber eine Rolle spielen. Viele Streptokokken sind Produzenten von Superantigenen, welche aufgrund ihrer starken Wirkung auf das Immunsystem durchaus als Auslöser von Schüben bei Autoimmunerkrankungen wie der Rheumatoiden Arthritis in Frage kommen. Gerade

normalerweise ruhig verlaufende Infektionen mit Streptokokken, bei denen lokal nur kleine Mengen Toxine produziert werden, könnten so für RA-Schübe verantwortlich sein. Diese Theorie ließe sich durch experimentelles Auslösen von Arthritis-assoziierten Entzündungen im Tiermodell mittels SAG-Gabe oder Infektion beweisen.

Folgende Fragen und Aufgabenstellungen wurden auf diesen Grundlagen in der vorliegenden Arbeit verfolgt:

- Lassen sich kreuzreagierende Antikörper zwischen dem M-Protein von Gruppe C-Streptokokken (MMC) und humanem Vimentin in Seren von Rheumatikern gehäuft nachweisen und könnte dieser Nachweis eine weitere diagnostische Methode zur Beurteilung dieser Erkrankung liefern?
 - Herstellung der benötigten Proteine durch Klonierung.
 - Entwicklung eines dafür geeigneten ELISA.
- Sind bei Rheumapatienten die nach einer Infektion mit *Chlamydia trachomatis* gebildeten kreuzreaktiven Antikörper zwischen chlamydialem und humanem HSP an der Entstehung der RA beteiligt? Findet man bei solchen Patienten höhere Antikörpertiter gegen chlamydiales HSP als in Kontrollenseren ohne rheumatische Beschwerden?
- Gibt es einen Abschnitt des chlamydialen HSP-Proteins (N- oder C-terminal), der die Produktion von Antikörpern stärker induziert und eher zu Kreuzreaktionen mit humanem HSP führen könnte?
- Kann in Mäusen mit chronischer Antigen-induzierter Arthritis durch die Applikation von Superantigenen ein neuer Entzündungsschub ausgelöst werden?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Begasungsbrutschrank Cellstar	Nunc
Brutschrank TH25	Edmund Bühler
Elektrophore Stromversorgung EPS200	Pharmacia Biotech
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	Feinoptik
ImageMaster VDS	Pharmacia Biotech
Inkubator Funktion Line	Heraeus Instruments
Kolbenhubpipetten, verschiedene Größen	Eppendorf / Labsystems
Kühlzentrifuge Rotina 35R	Hettich
Mehrkanalpipette	Socorex
Präparationsbesteck	Aeskulap
Sequenzierautomat ABI PRISM 310	Applied Biosystems
Spectrophotometer Biofuge pico	Heraeus Instruments
Thermomixer 5436	Eppendorf
Thermozykler	PerkinElmer

2.1.2 Kommerzielle Kits

Anti-CCP-Elisa (IgG)	Euroimmun
BigDye DNA sequencing Kit 2.0 ABI Prism	Perkin Elmer Applied Biosystems
Invisorb Spin PCRapid Purification Kit 250	Invitek
pGEM-T-EASY vector Kit	Promega
Qiagen cloning vector Kit pDrive	Qiagen
Qiagen expression vectors: pQE9	Qiagen
pQE60	Qiagen
pQE70	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit 250	Qiagen
puReTaq Ready-to-go-PCR Kit	Amersham Biosciences
SeroCT™-IgG	Savyon Diagnostics

2.1.3 Seren

2.1.3.1 Rheumaseren

Die untersuchten Seren stammen aus verschiedenen Einrichtungen des Universitätsklinikums Jena, von Patienten, die aufgrund rheumatischer Erkrankungen in Behandlung waren. Der Rheumafaktortiter der hier verwendeten Seren lag über 1/256.

2.1.3.2 Kontrollseren

Drei Gruppen von Kontrollseren wurden für die Untersuchungen verwendet, wobei keiner der Spender zum Zeitpunkt der Blutentnahme unter rheumatischen Beschwerden litt:

- Seren von Mannschaftssportlern, bereitgestellt durch die Universität Frankfurt
- Seren von Patienten (Tumor- und Unfallpatienten) der Rehabilitationsklinik Tabarz, gesammelt von Herrn Weissflog
- Seren von Mitarbeitern des Klinikums Jena

2.1.4 Antikörper

Schwein-Anti-Kaninchen HRP	DAKO
Ziege-Anti-Maus HRP	DAKO
Maus-Anti-Vimentin	DAKO
Kaninchen-Anti-Human IgG HRP	DAKO
Anti-Pentahistidin HRP	Qiagen

2.1.5 Kulturmedien

2.1.5.1 Medium zur Kultur von T-Zellen

RPMI1640 (Gibco) als komplett Medium supplementiert mit

Streptomycin	(Grünenthal)	0,1 mg/ml
Penicillin-G	(Jenapharm)	100 U/ml
Glutamin	(Gibco)	2 mM
Hepes	(Gibco)	10 mM
Natriumpyruvat	(Gibco)	1 mM
Fetales Kälber Serum	(Gibco)	10 %

2.1.5.2 LB (Luria-Bertani) – Medium

Trypton	(Difco)	1 %
Hefeextrakt	(Merck)	0,5 %

NaCl	(Merck)	1 %
für LB-Nähragar zusätzlich		
Agar	(Difco)	1 %

2.2 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

2.2.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Vervielfältigung bestimmter DNA-Abschnitte erfolgte mittels PCR. Im verwendeten Ready-to-go Kit (Amersham) waren Nucleotide, die *taq*-Polymerase sowie $MgCl_2$ und Reaktionspuffer in der jeweils nötigen Konzentration bereits vorhanden, so dass nur noch Template-DNA, vorwärts (fw) Primer, rückwärts (rv) Primer und Aqua dest. für ein Gesamtvolumen von 25 µl hinzugegeben werden mussten. Je Primer war eine Konzentration von 0,5 µg pro Reaktion ausreichend. Die Taq-Polymerase produziert während der PCR A-Überhänge, welche die nachfolgende Klonierung (T-Cloning in pDrive Vector) der PCR-Fragmente erleichtern.

Ein typischer PCR-Zyklus, der in einem Thermozykler (GeneAmp PCR Systems PerkinElmer, Applied Biosystems) durchgeführt wurde, besteht aus drei Schritten: der Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 95°C, der Anlagerung der Primer an die DNA-Einzelstränge (48-60°C) und der Extension der Primer durch die Polymerase (72°C). Dieser Zyklus wurde mehrmals wiederholt. Eingeschlossen wurden diese Zyklen von einer 10 minütigen Denaturierungsphase (95°C) am Anfang und einer verlängerten Extensionsphase (10 min bei 72°C) am Ende der Reaktionskette. Die Temperatur der Anlagerungsphase wurde durch die Sequenz der Primer bestimmt und variiert (siehe Tab.4).

Tab.4: Ablaufplan einer typischen PCR

Anzahl der Zyklen	1		25-30		1	
Denaturierung	95°C	10 min	95°C	30 sec		
Primer Anlagerung			48-60°C	30 sec		
Extension			72°C	1-3 min	72°C	10 min

2.2.2 Primer

Sämtliche verwendeten Primer wurden von Dr. E. Birch-Hirschfeld vom Institut für Virologie der FSU Jena synthetisiert und sind in ihrer Sequenz in Tabelle 5 unter Angabe Ihrer Anlagerungstemperatur und, wenn vorhanden, angefügten Enzymschnittstellen dargestellt.

Tab.5: Verwendete Primer

Name	PrimerSequenz	Schnittstellen	TM (°C)
Vim.fw	CCA TGG TCG CCA ACT ACA TCG ACA AG	Nco I	58,9
Vim.rv	GGA TCC ACT TTC ATA TTG CTG ACG TAC GTC	BamH I	59
MMC.fw	CCA TGG GCA GCA TGG AAG TTA GTG G	Nco I	55
MMC.rv	GGA TCC TTC TAG TTG TTT AAT TTG ATC ATC TTT TTC AGC	BamH1	52,9
pQEinsert.fw	GAT AAC AAT TAT AAT AGA TTC AAT TGT G		53,9
PQEinsert.rv	CAT TAC TGG ATC TAT CAA CAG GAG TCC		55,9
T7var.fw	GAA TTG TAA TAC GAC TCA CTA TAG G		50
Sp6.rv	ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAT AC		51
ChIHSP-C.fw	CCA TGG TAA TGG CGT TAG CTA CTT TGG TCG TG	Nco I	54,2
ChIHSP-C.rv	AGA TCT TCC TGC GCC AGG CAT TGC TGG AGC	Bgl II	62
ChIHSP-N.fw	GCA TGC TAA GGA GCG CAT CAA TGG TCG CT	Sph I	55,7
ChIHSP-N.rv	AGA TCT AGT AGC TAA CGC TTC GCC TAC	Bgl II	54,8
SPEC.fw	CCA TGG TAA TGG ACT CTA AGA AAG ACA TTT CG CG	Nco I	51
SPEC.rv	AGA TCT TTT TTC AAG ATA AAT ATC GAA ATG AC	Bgl II	46,3
SPEZ.fw	CGA TAG TCA GCA AGT ATA TCT ACA AAA TTG TTA ATG	Sal I	55,8
SPEZ.rv	AAC TGC AGT TAG GAG TCA ATT TC	PST I	49,9
SPEA.fw	TTC CAT GGT AAT GCA AGA GGT ATT TGC TCA AC	Nco I	57,8
SPEA.rv	GGA TCC CTT GGT TGT TAG GTA GAC TTC	BamH I	57,4
SPEG.fw	CAC CAT GGA TGA AAT ATT AAA AGA TTT GAA AGC AAG		49,1
SPEG.rv	TCG CGT TTT TAA GTA GAT ATC AAA ATG AC		52

2.2.3 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzreaktion von PCR-Produkten bzw. Plasmidsubklonen wurde nach der Kettenabbruchmethode mit dem Big Dye Termination Cycle Sequencing Kit 2.0 (Perkin Elmer Applied Biosystems) nach Protokollen des Herstellers durchgeführt. Die Sequenzanalyse erfolgte in dem Kapillar-Sequenzierungsautomat API Prism 310 von Applied Biosystems.

2.2.4 Klonierung

2.2.4.1 Subklonierung

Für die Herstellung rekombinanter Proteine war das Klonieren von PCR-Produkten in *E. coli* Zellen nötig. Das mit spezifischen Primern vervielfältigte DNA-Stück wurde in einem 1%igen Agarosegel (QualexGold™ Agarose [Hybaid-AGS]) aufgetrennt. Das Sichtbarmachen der DNA erfolgte mit Hilfe der dem Gel zugegebenen Ethidiumbromidlösung (1:40000) unter UV-Licht. Die entsprechenden DNA-Fragmente wurden aus dem Gel ausgeschnitten, mit dem QIAquick Gel Extraction Kit 250 (Qiagen) gelöst, gereinigt und mit Aqua dest. eluiert. Diese in der Vakuumzentrifuge eingeeengten PCR-Produkte wurden zur Subklonierung direkt dem Ligationsgemisch beigegeben. Hierbei wurden pGEM-TEasy (Promega) und pDrive (Qiagen) als T-Klonierungsvektoren verwendet. Die Ligation erfolgte nach Vorschrift des Herstellers. Die Transformation der Plasmide in die chemisch kompetenten Zellen (JM109 [Promega], EZ [Qiagen]) wurde mittels Hitzeschock bei 42°C durchgeführt. Die Selektion der rekombinanten Klone erfolgte durch Zugabe der für das Plasmid beschriebenen Antibiotika in entsprechenden Konzentrationen (100 µg/ml Ampicillin, 25 µg/ml Kanamycin) zum LB-Medium. Weiterhin wurden die Klone mittels Plasmid-PCR (Primer T7var.fw und Sp6.rv) auf Vorhandensein des Inserts untersucht und selbiges durch Sequenzierung auf Vollständigkeit und die korrekte Orientierung überprüft.

2.2.4.2 Klonierung in Expressionsvektoren

Zur Klonierung der kodierenden DNA-Fragmente in Expressionsvektoren (pQE9, pQE60, pQE70 [alle Qiagen], pET101 [Invitrogen]) wurden die Plasmide der Subklone isoliert und mit entsprechenden Restriktionsenzymen (AGS) an den durch die Primer eingeführten Schnittstellen (siehe Tab.5) gespalten, in die entsprechend verdauten Vektoren ligiert und anschließend transformiert (siehe Tab.6).

Das Vorhandensein des Plasmids wurde durch Plasmidisolierung, Sequenzierung und die Expression des Proteins nach Induktion der Kultur mit Isopropylthiogalaktopyranosid (IPTG [Promega]) im anschließenden Westernblot überprüft.

Nach erfolgreicher Induktion mit IPTG wurden die *E. coli* Zellen mittels Zentrifugation vom Kulturmedium getrennt und durch Abkühlen auf -70°C (mindestens 1 Stunde) und anschließender 1-2 stündiger Inkubation in denaturierendem Guanidinpuffer (6 M Guanidin-HCl, 0,1 M Phosphat, 0,01 M Tris-HCl) aufgeschlossen; unlösliche Zellbestandteile wurden abzentrifugiert und die Proteine wie unten beschrieben an Nickel-Agarose gereinigt.

Tab.6: Verwendete Expressionsvektoren, Bakterienstämme und Zelllinie

Protein	Expression		Herkunft	His-tag
	Vektor	Zellen		
Vimentin	pQE60	M15[pREP4] (Quiagen)	SFC (Rödel <i>et al.</i> , 2002)	C-terminal
MMC	pQE60	M15[pREP4] (Quiagen)	GCS 25287	C-terminal
HSP-N	pQE60	M15[pREP4] (Quiagen)	<i>C. trachomatis</i> L2	C-terminal
HSP-C	pQE70	SG1306	<i>C. trachomatis</i> L2	C-terminal
SPE-G	pET101	BL21Star (Invitrogen)	GGs 39072	C-terminal
SPE-A	pQE60	SG1306	GAS NY5	C-terminal
SPE-C	pQE60	SG1306	GAS NY5	C-terminal
SMEZ	pQE9	SG1306	GAS 27195	N-terminal

2.3 Reinigung von Proteinen

2.3.1 Affinitätschromatographie

Die Reinigung der rekombinanten Proteine erfolgte im ersten Schritt durch Affinitätschromatographie über die Bindung der durch Klonierung an das Amino- bzw. Carboxylende der Proteine angefügten Histidine an Nickel-NTA (Nickel-Nitrilotri-essigsäure) Agarose (Qiagen). Der Zellaufschluss erfolgte nach dem Einfrieren der Zellen bei -70°C in einem denaturierenden Guanidinpuffer (6 M Guanidin-HCl, 0,1 M Phosphat, 0,01 M Tris-HCl – pH 8). Die so gelösten Proteine wurden über eine Ni-NTA-Agarose-Säule filtriert. Zur Reinigung und Elution der gebundenen Proteine wurde ein Harnstoffpuffer (8 M Harnstoff, 0,1 M Phosphat, 0,01M Tris-HCl) mit abnehmendem pH- Wert (pH 8 – pH 4,5) und ein glyzinhaltiger Harnstoffpuffer (8 M Harnstoff, 0,2 M Glyzin, pH 2,5) verwendet.

Alle erhaltenen Fraktionen wurden im Dot-Blot auf His-tagged Proteine untersucht (siehe Dot-Blot-Analyse), proteinhaltige Fraktionen in der SDS-PAGE auf Reinheit überprüft, gepoolt und, falls erforderlich, einem weiteren Reinigungsschritt durch Ionenaustauschchromatographie unterzogen.

2.3.2 Ionenaustauschchromatographie

Einige rekombinante Proteine wie das Vimentinfragment (Isoelektrischer Punkt pI bei 4,89) oder das MMC-Fragment MC (pI bei 5,35) wurden durch Anionenaustauschchromatographie über eine ResourceTMQ Säule in einer FPLC-Anlage (beides Amersham Bioscience) weiter gereinigt. Dazu wurden die Proteine durch Dialyse in einen neutralen Harnstoffpuffer überführt (Puffer A: 6 M Harnstoff, 1 mM Tris, pH 7). Die Elution der Proteine erfolgte durch Anlegen eines NaCl-Gradienten von 1 M NaCl (Puffer B: 6 M Harnstoff, 1 mM Tris, 1 M

NaCl, pH 7). Die erhaltenen Fraktionen wurden im Dot-Blot überprüft und die His-Tag positiven Fraktionen gepoolt (siehe unter Dot-Blot-Analyse).

2.4 Elektrophoretische und immunologische Arbeitsmethoden

2.4.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen zur Reinheitsanalyse und für eine weitere immunologische Untersuchung mittels Proteinblotting wurde mit der Miniprotein-elektrophoreseapparatur von Bio-RAD (Mini-Proteau II) durchgeführt.

Je nach erwarteter Proteingröße wurden Polyacrylamidgele von 10 % (höhermolekulare Proteingemische), 12,5 % oder 15 % (niedermolekulare Proteingemische) zur Trennung verwendet und wie in Tabelle 7 beschrieben angesetzt. Das ungefähr 80 mm x 50 mm große Trenngel wurde von einem Sammelgel (Tab.7) der Größe 80 mm x 20 mm überdeckt, in welchem sich auch die Taschen für das Auftragen des Proteingemisches befanden.

Tab.7: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele in verschiedenen Konzentrationen

	10,0 %	12,5 %	15,0 %	Sammelgel
Aqua dest.	4,2 ml	3,5 ml		4,5 ml
Trenngelpuffer 0,5 M Tris (Roth) pH 6,8 0,4 % SDS (Roth)	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	
Sammelgelpuffer 1,5 M Tris pH 8,8 0,4 % SDS				2 ml
30 % Acrylamidlg. auf 50 ml H ₂ O 15 g Acrylamid (Pharmacia Biotech) 0,4 g Bis-Acrylamid (Roth)	3,3 ml	4,0 ml	7,5 ml	1 ml
APS (Roth)	150 µl	150 µl	150 µl	70 µl
TEMED (Pharmacia Biotech)	5 µl	5 µl	10 µl	10 µl

Das Denaturieren der Proben erfolgte im Aufschlusspuffer (10 mM Tris-HCl, 5 % Mercaptoethanol, 1 % SDS, 1 mM EDTA, Bromphenolblau, Glycerin) durch fünfminütiges Erhitzen bei 95°C. Als Laufpuffer wurde Tris-HCl-Glyzinpuffer (25 mM Tris-HCl, 0,192 M Glyzin, 0,1 % SDS, pH 8,3) verwendet.

Das Anfärben der Proteine im Gel wurde mit Coomassie-Brilliantblau R 250 durchgeführt.

2.4.2 Western-Blot-Analyse

Für weitere Arbeiten wurden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Schleicher und Schuell) mit einer Porengröße von 0,2 µm geblottet. Der Proteintransfer erfolgte in einer Tankblotapparatur von BIO-RAD bei 250 mA für mindestens eine Stunde im Transfer-Puffer (0,025 M Tris, 0,192 M Glyzin, 20 % Methanol, pH 8,3).

Zur Überprüfung des erfolgreichen Transfers wurden die Proteine auf der Membran mit Ponceaurotlösung (0,2 % Ponceau S in 3 % (m/v) Trichloressigsäure und 3 % (m/v) Sulfosalicylsäure) reversibel angefärbt.

Vor dem Antigennachweis wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran durch mindestens 10 min Inkubation mit einer Blocklösung (1 % Magermilch in PBS-Puffer mit 0,1 % Tween 20 [PBST]) bei Raumtemperatur abgesättigt.

Die Inkubation mit Antiseren oder Antikörpern erfolgte für drei Stunden bei Raumtemperatur und anschließend für weitere 3 Stunden bei 4°C in 0,1 % Magermilch/PBST-Lösung. Die Detektion erfolgte mittels Peroxidase-gekoppelten Antikörpern im direkten bzw. im indirekten Immunnachweis. Zur Färbung des Enzym-markierten Immunkomplexes diente 3-Amino-9-ethyl-carbozol als Substrat in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid in einer 0,1 M Natriumazetatlösung (pH 5,0). Die Reaktion wurde durch eine wässrige Natriumthiosulfatlösung abgestoppt, die entwickelten Folien lichtgeschützt aufbewahrt.

2.4.2.1 Nachweis von Antikörpern gegen chlamydiale Hitzeschockproteine in Humanseren

Der Nachweis von Antikörpern gegen den N- und C-terminalen Teil des HSP60 von *Chlamydia trachomatis* erfolgte mittels beschriebener Western-Blot-Methode, allerdings erfolgte das Abblocken unspezifischer Bindungsstellen über Nacht bei 4°C.

2.4.3 Dot-Blot-Analyse

Das Dotblotting ist eine schnelle Methode, die verwendet wurde, um Elutionsfraktionen auf ihre Proteinhaltigkeit zu überprüfen. Drei Mikroliter jeder Fraktion wurden auf eine Nitrozellulosemembran gegeben und wie im Western-Blot-Verfahren geblockt, mit Peroxidase-gekoppelten Anti-Penta-His-Antikörpern inkubiert und anschließend entwickelt.

2.4.4 Enzyme-linked Immunosorbent-Assay (ELISA)

Bei dem ELISA handelt es sich um ein serologisches Testverfahren zum Nachweis von Antikörpern oder Antigenen. Für den Antikörpernachweis wird das Antigen in den Vertiefungen von Mikrotiterplatten an die Plastikoberfläche gebunden. Das zu untersuchende Patientenserum wird aufgebracht und eine Antigen-Antikörperbindung ermöglicht. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird das Serum mit den unspezifischen oder überschüssigen Antikörpern mittels Waschpuffer abgewaschen. Das gebundene menschliche Immunglobulin (z. B. IgG) wird mit einem weiteren Antikörper nachgewiesen. Diese sekundären Antikörper gegen Immunglobuline sind mit Enzymen (z.B. Peroxidase) markiert, womit die Menge des gebundenen Antikörpers nach der Darstellung des Enzyms photometrisch bestimmt werden kann.

2.4.4.1 Streptavidin-ELISA

Es ist möglich, Antikörper gegen kleinere Peptide nachzuweisen, wenn diese biotinyliert sind und über Biotin an das auf einer Mikrotiterplatte (Nunc) gebundene Streptavidin gekoppelt werden (Griesman *et al.*, 1991; Künemund *et al.*, 1998). Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass für bestimmte Proteine sehr spezifische antigene Regionen herausgefiltert werden können und nicht das gesamte, mit dem Protein reagierende Antikörperspektrum detektiert wird.

Die in dieser Arbeit verwendeten Peptide wurden nach Sequenzen aus dem MMC-Protein und Vimentin von der Firma ThermoHybaid synthetisiert. Sie besitzen homologe Aminosäurestrukturen, die helikale Heptadstrukturen (coiled-coil Domänen) bilden und somit als kreuzreaktive Epitope in Frage kommen (Geyer *et al.*, 1999). Diese kreuzreaktiven Antikörper galt es in Patientenseren nachzuweisen.

Folgende Peptide wurden untersucht, wobei korrelierende Motive hervorgehoben wurden und die Zahlen in der Klammer die Position der Aminosäuren (Ein-Buchstaben-Kode) im Ausgangsprotein angeben:

Peptid 1	MMC Motiv 2 (90-110)	I E K K E G D I S D L K E K L Q N L K D D
Peptid 2	MMC Motive 3 (129-149)	L A E K D K D I S D L K E K L Q N L K D D
Peptid 3	Vimentin Motiv (175-195)	R D N L A E D I M R L R E K L Q E E M L Q

Die Beschichtung der Mikrotiterplatten mit 5 µg/ml rekombinanten Streptavidin (Roche) erfolgte in einer 0,05 M Na₂CO₃-Lösung, pH 10, mit 100 µl pro Well für 1 Stunde bei 37°C. Vor und nach dem Blocken der Platte mit 5 % Magermilch in PBSST (1 M NaCl in PBST-Puffer) für 1 Stunde bei Raumtemperatur wurden die Wells mit PBSST gewaschen. Die biotinylierten Peptide wurden in einer Konzentration von 0,5 µg/ml in PBSST mit je 100 µl pro Well auf die Platte aufgetragen und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem abschließenden Waschschrift wurden die Platten getrocknet, versiegelt und bei 4°C bis zur Testung der Seren gelagert.

Die zu untersuchenden Seren wurden im gewünschten Konzentrationsgefälle (1:20 bis 1:2560) in PBSST auf die Platten aufgetragen und bei Raumtemperatur für 2 Stunden inkubiert. Für alle anschließenden Schritte, einschließlich den folgenden Waschschriften, wurde ein Tris-T Puffer (0,5 M NaCl, 0,1 % Tween 20, 0,001 M Tris, pH 7,4) verwendet. Die Inkubation des Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörpers (anti-Human IgG, verwendete Konzentration 1:3000) erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur und wurde von einem Waschschrift gefolgt. Zum Ablauf der enzymatischen Farbreaktion wurde die Substratlösung (eine o-Phenylenediamin-Tablette [Sigma] in 50 ml 0,05 M NaAc, pH 5,0 plus 20 µl H₂O₂) in die Wells gegeben und bei Dunkelheit und Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf einer Stunde wurde die Reaktion durch Zugabe einer 2 M H₂SO₄-Lösung gestoppt und sofort im ELISA-Reader STL.RainBow (STL. Labinstruments Austria) bei 429 nm Wellenlänge gemessen.

2.4.4.2 ELISA zum Nachweis von Vimentin- und MMC-Protein-Fragment-Antikörpern

Für diesen Versuch wurden ein rekombinantes Fragment des M-Proteins der Gruppe C-Streptokokken hergestellt, das die gleichen Epitope wie die im Streptavidin-ELISA untersuchten Peptide aufwies. Mikrotiterplatten wurden mit den zu untersuchenden rekombinanten Proteinen (Vimentin- bzw. MMC-Protein-Fragment) in einer Konzentration von 5 mg/ml in einer 0,05 M Natriumcarbonatlösung für eine Stunde bei 37°C beschichtet.

Nach einem Waschschrift mit PBSST folgte das Blocken der Wells mit 1 % Magermilch in PBSST-Puffer für eine Stunde bei Raumtemperatur.

Im Anschluss an einen weiteren Waschgang wurden die Platten getrocknet und konnten versiegelt bei 4°C für bis zu 6 Wochen gelagert werden.

Die Serentestung wurde analog zum oben beschriebenen Streptavidin-ELISA durchgeführt.

2.4.4.3 ELISA zum Nachweis von zyklisch citrulliniertem Peptid (CCP)

Der Nachweis von IgG-Antikörpern gegen die seltene, in antigenen Epitopen vorkommende Aminosäure Citrullin, die einen hochspezifischen Marker für die RA darstellen, erfolgte mit Hilfe des CCP-ELISA-Kits von Euroimmun nach Anleitung des Herstellers.

2.4.4.4 ELISA zum Nachweis von *Chlamydia trachomatis* IgG

C. trachomatis spezifische Antikörper gegen das Hauptmembranprotein wurden mit dem SeroCT™-IgG-ELISA-Kit von Savyon Diagnostics nach Anleitung des Herstellers nachgewiesen. Dadurch wurde eine vorangegangene, aber keine akute Infektion mit diesem Erreger überprüft.

2.5 Tiere und Haltungsbedingungen

Für die *In-vivo*-Experimente wurden 6-8 Wochen alte weibliche C57BL/6 Mäuse verwendet, welche vom Institut für Versuchstierkunde der FSU Jena bzw. von Charles River (Sulzfeld) bezogen wurden. Die Mäuse wurden unter Standardbedingungen bei einem 12 h Hell-Dunkel-Rhythmus mit Standard-Diätpellets (Altromin) und Wasser *ad libitum* gehalten.

2.6 Lymphozyten-Transformationstest

2.6.1 Präparation von Th-Zellen

Frisch getöteten, gesunden Mäusen wurde die Milz unter aseptischen Bedingungen entnommen und bis zur weiteren Bearbeitung in RPMI-komplett aufbewahrt. Die Zellen wurden durch Zerzupfen der Milz mit einer sterilen Pinzette und anschließender Passage durch ein Zellsieb gewonnen. Nach Waschen der Zellsuspension mit RPMI wurden die Zellen durch Zentrifugation von Geweberesten befreit. Die Zerstörung von Erythrozyten erfolgte mittels zweiminütiger Inkubation der Milzsuspension mit 0.83% NH₄-Cl/Tris-Lösung (pH 7,65). Im Anschluss wurden die Zellen abzentrifugiert, in RPMI-komplett resuspendiert und die Lebendzellzahl mittels Trypanblau-Färbung (Gibco) bestimmt.

2.6.2 Proliferationstest

Für den Transformationstest wurden sterilfiltrierte Superantigene (SAG) mit der Zellsuspension in eine Mikroplatte (Greiner) pipettiert. Das Endvolumen entsprach 250 µl, die Zellkonzentration betrug 10⁶ Zellen/ml. Die Konzentration der Superantigene variierte von 0,0256 ng/ml bis 48,0 µg/ml. Die Platten wurden abgedeckt und für 3 Tage (72 Stunden)

bei 37°C unter 5 %iger CO₂-Atmosphäre inkubiert. 18 Stunden vor Ablauf der 3 Tage erfolgte die Zugabe von H³-Thymidin in einer Konzentration von 0,5 µCi/Well. Nach einer Gesamtinkubationszeit von 72 Stunden wurden die Platten bis zur Auswertung im TopCount – 5.00 (Peckard/PerkinElmer) eingefroren.

2.7 Antigen-induzierte Arthritis (AIA)

2.7.1 Immunisierung und Arthritisinduktion

Um die Wirkung bestimmter Superantigene auf eine bestehende chronische Arthritis zu testen, wurde in den Versuchstieren eine Antigen-induzierte Arthritis ausgelöst (AIA) (Gruppeneinteilung siehe Tab.8).

21 Tage vor der Arthritisinduktion erfolgte die erste Immunisierung der Mäuse mit 100 µg mBSA (Sigma) in einer Emulsion aus 50 µl physiologischer NaCl-Lösung (Frisenius) und 50 µl, mit 2 mg/ml *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (DIFCO) supplementiertem Freud'schen Adjuvans (Sigma), subkutan (s.c.) in die rechte Flanke. Eine zweite Immunisierung wurde 14 Tage vor Auslösen der Arthritis dorsal s.c. in die Schwanzwurzel vorgenommen. Zur Unterstützung der Immunantwort (Ryan *et al.*, 1998) erhielten alle Tiere zu beiden Immunisierungszeiten intraperitoneal (i.p.) 10⁹ hitze-inaktivierte Bordetella pertussis-Keime (Chiron Behring).

Am Tag 0 wurde die Arthritis unter Äthernarkose durch intraartikuläre (i.a.) Injektion von 100 µg mBSA in 25 µl physiologischer NaCl-Lösung in das rechte Kniegelenk ausgelöst.

2.7.2 Superantigenstimulation

Nach Erreichen einer chronischen Phase wurden am 7. bzw. am 21. Tag Superantigene, in einer Konzentration von 100 µg/kg Lebendgewicht bis 1 mg/kg, intravenös (i.v.) (125 µl) bzw. i.a. (25 µl / 50 µl) appliziert. Eine Gruppe erhielt anstelle von Superantigenen das beschriebene M-Protein- Fragment der GGS. Einer Kontrollgruppe wurde auf entsprechende Weise PBS-Lösung injiziert.

2.7.3 Gelenkschwellung

Der Verlauf der induzierten Arthritis und die Reaktivierung der in die chronische Phase übergegangenen Arthritis wurde durch Messung der Kniegelenkschwellung mit einem Außentaster (Kroeplin) überwacht. Die absolute Schwellung wurde als Differenz zur Messung am Tag 0 und in Prozent angegeben (Tag X – Tag 0 / Tag 0 x 100). Neben der

Gelenkschwellung wurde am Versuchsende durch histologische Analyse des Kniegelenks ein histologischer Arthritisindex erhoben (siehe Histologie).

2.7.4 Versuchsverlauf

Abhängig vom Verlauf der Gelenkschwellung wurden die Mäusegruppen durch zervikale Dislokation getötet (Tag 8, 10, 21) oder einer weiteren Arthritisinduktion am Tag 14 (getötet Tag 30) bzw. erneuter Superantigen- / M-Proteingabe am Tag 27 (getötet Tag 35) unterzogen (siehe auch Tab.8)

Vor dem Ausbluten wurde das Körpergewicht der Mäuse bestimmt. Bei der Präparation wurden neben dem Serum auch die Milzen sowie rechte und linke Kniegelenke gewonnen. Nach dem Wiegen der Milzen wurden selbige in Tissue-T (Sakura) getaucht und eingefroren. Die enthäuteten Kniegelenke wurden für die histologische Bewertung in gepuffertem Formalin (4,5%) fixiert.

Tab.8: Einteilung der Versuchsgruppen und Versuchsablauf

Versuch Nr.	Gruppen	Anzahl Mäuse	mBSA Gabe Tag	gegebenes Superantigen/ Protein	Tage		Superantigengabe µg/Maus		Applikation		Versuchs-ende Tag
					1.	2.	1.	2.	1.	2.	
I	A	8	0	SPE-A	21	27	2	2 x 0,44	i.v.	i.a. beide Knie	35
	C	8	0	SPE-C	21	27	2	2 x 0,44	i.v.	i.a. beide Knie	35
	Z	8	0	SMEZ	21	27	2	2 x 0,44	i.v.	i.a. beide Knie	35
	MMC	8	0	MMC	21	27	2	2 x 0,44	i.v.	i.a. beide Knie	35
	G	8	0	SPE-G	21	27	2	2 x 0,44	i.v.	i.a. beide Knie	35
	Kont.	8	0	-	21	27	0	2 x 0,44	i.v.	i.a. beide Knie	35
II	i.a. 2 µg	7	0	SPE-G	7		2		i.a. rechtes Knie		1. 8 2. 21
	i.a. 20 µg	7	0	SPE-G	7		20		i.a. rechtes Knie		10 21
	i.a. Kont.	7	0	-	7		0		i.a. rechtes Knie		10 21
III			1.	2.							
	i.v. 2 µg	7	0	14	SPE-G	7	2		i.v.		30
	i.v. 10 µg	7	0	14	SPE-G	7	10		i.v.		30
	i.v. 20 µg	7	0	14	SPE-G	7	20		i.v.		30
	i.v. Kont.	6	0	14	-	7	0		i.v.		30
IV	+BSA/+SPE-G	6	0	SPE-G	7		20		i.a. rechtes Knie		8
	-BSA/+SPE-G	5	keine	SPE-G	7		20		i.a. rechtes Knie		8
	-BSA/-SPE-G	5	keine	-	7		0		i.a. rechtes Knie		8

2.7.5 Histologie

Nach dem Fixieren der Kniegelenke in Formalin wurden diese mit Ethylen-diamintetraessigsäure (EDTA) entkalkt, in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und abschließend in Paraplast eingebettet. Anschließend wurden frontale Schnitte der gesamten Gelenke angefertigt, auf Objektträger gebracht, in absteigender Alkoholreihe entparaffiniert

und schließlich mit Hämatoxylin-Eosin (Hämatoxylin [Merck], Eosin-Natrium [Laborchemie Apolda]) gefärbt.

Die Bewertung der Schnitte erfolgte durch unabhängige Gutachter ohne Kenntnis der Versuchsbedingungen. Beurteilt wurden neben Zeichen einer akuten Entzündung (Exsudat, granulozytäre Infiltration) und einer chronischen Entzündung (synoviale Hyperplasie, mononukleäre Infiltration der Synovialmembran, periartikuläre Strukturen) auch die Destruktion von Knorpel und Knochen (siehe Tab.9). Die Summe der bei der Bewertung erteilten Punktzahl ergab den histologischen Index der Arthritis.

Tab.9: Histologische Kriterien der AIA

Bewertung	Akute Entzündung
1	Exsudat
2	einzelne Granulozyten
3	fleckförmiges Granulozytenexsudat
3	massives Granulozytenexsudat
1	granulozytäre Infiltration der Synovialmembran
2	einzelne Granulozyten
3	kleinherdig oder diffus mäßig
+1	mittelgradig bis dicht
+1	wenn Fibrin deutlich nachweisbar
+1	wenn periartikuläres Gewebe nachweisbar
	Chronische Entzündung
1	Synoviale Hyperplasie (=Hyperplasie der Deckzellschicht)
2	geringe Hyperplasie, keine Aktivierung der Deckzellschicht
3	oder
3	keine Hyperplasie, Aktivierung von mehr als 50% Deckzellschichtzellen
2	> fleckförmige Hyperplasie mit Aktivierung der Deckzellschichtzellen
3	deutliche Hyperplasie
0,5	mononukleäre Infiltration der Synovialmembran
1	herdförmig, schütter
1,5	überwiegend schütter
2	überwiegend schütter, häufig mäßig
2,5	überwiegend mäßig
3	überwiegend mäßig, häufig dicht
3	überwiegend dicht
1	periartikuläre Strukturen (Fibrose, Infiltration)
2	geringe Fibrose/Infiltration
3	mäßige Fibrose/Infiltration
3	stark fibrös verbreiterte/dichte Infiltration
	Destruktion Knorpel/Knochen
1	minimaler Gewebsdefekt oder eine Gruppennekrose von Chondrozyten
2	>1 kleiner Defekt oder flächenhafte Chondrozytennekrosen
3	oder multiple Gruppennekrosen
3	größere Defekte (>10% einer Gelenkfläche)
4	maßiver Defekt (>50% einer Gelenkfläche) oder mehrere große Defekte

2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Untersuchungsergebnisse erfolgte mit dem Programm SPSS 11.5. Die statistische Signifikanz von Häufigkeitsverteilungen wurde im Chi-Quadrat-Test geprüft. In Fällen, in denen eine Analyse der Daten mittels Chi-Quadrat-Test nicht möglich war, da mehr als 20 % der Zellen eine Häufigkeit von kleiner als 5 aufwiesen, wurde der Fisher-Yeats-Test zur Ermittlung der Signifikanz verwendet. Zur Ermittlung des Unterschiedes zwischen den Werten verschiedener Gruppen wurden die Daten mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Test überprüft. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde dabei als statistisch signifikant, eine von $p < 0,001$ als hochsignifikant bewertet. Der Spearman-Rang-Korrelations-Koeffizient wurde zur Bestimmung von Zusammenhängen zwischen den Parametern errechnet. Für Koeffizienten von $\leq 0,3$ wurden keine Zusammenhänge zwischen den Gruppen angenommen. Ab einem Koeffizienten von $> 0,3$ bzw. $\geq 0,07$ wurde der Zusammenhang der Gruppenmittlere als mittel bzw. stark bewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Induktion eines Arthritisschubes in der Maus durch Superantigengabe

Superantigene können zu einer Aktivierung von bis zu 20 % einer CD4⁺T-Zellpopulation führen. Kommt es dabei auch zu einer Aktivierung bereits vorhandener autoreaktiver T-Zellen, könnte durch diese Stimulierung ein akuter Arthritisschub in Patienten mit chronischer Rheumatoider Arthritis ausgelöst werden.

Zur Überprüfung dieser These wurde in Mäusen eine Antigen-induzierte Arthritis ausgelöst (siehe auch Methodenteil). Nach dem Abklingen der akuten Phase (ab Tag 7) erfolgte eine intraartikuläre oder intravenöse Superantigengabe. Der Verlauf der arthritischen Entzündung wurde durch Messung der Gelenkschwellung verfolgt. Nach Ablauf des Versuches wurden zusätzlich die Milzgewichte bestimmt und ein histologischer Arthritisbefund erhoben.

3.1.1 Proliferationstest

In einem Vorversuch wurde die Wirkung einiger rekombinanter Superantigene der Gruppe A-Streptokokken auf Mäuselymphozyten *in vitro* untersucht, um eine Aussage über die für die *in vivo* nötigen Superantigenkonzentrationen zu erlangen. Zusätzlich wurde das im ELISA untersuchte MMC-Fragment, welches an sich kein Superantigen ist, mit in den Test einbezogen.

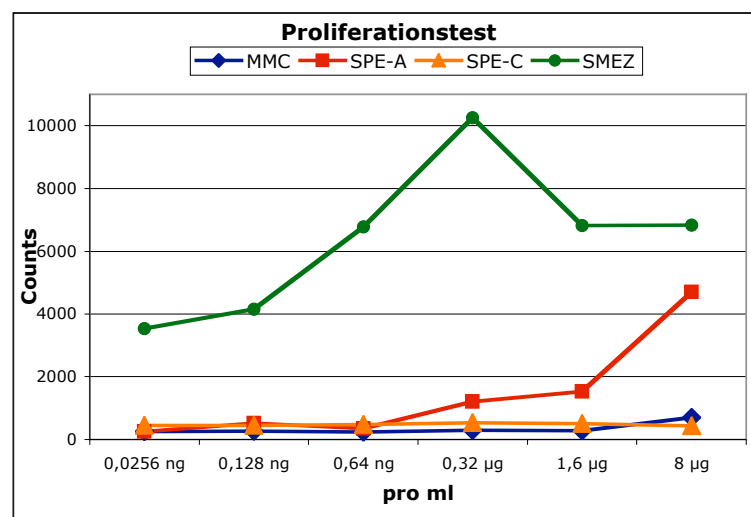


Abb.4: Mäuselymphozyten im Proliferationstest mit verschiedenen Superantigenen und dem MMC-Fragment

Bei den Superantigenen SPE-A und SMEZ konnte eine deutliche Proliferation der Lymphozyten beobachtet werden. Für SMEZ war bei einer Konzentration von 0,32 µg/ml die

höchste Stimulation zu verzeichnen, bei weiter ansteigender Konzentration des Superantigens fiel die Proliferation der Lymphozyten wieder etwas ab (Abb.4). Ein die Proliferation ganz unterdrückender zytotoxischer Effekt setzte jedoch in dem ausgetesteten Konzentrationsbereich noch nicht ein. Für SPE-A begann die Stimulierung der T-Zell-Proliferation bei einer Konzentration von 0,32 ng/ml. Für das MMC-Fragment und das SPE-C konnte im untersuchten Konzentrationsbereich keine Stimulierung der Proliferation gemessen werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für die ersten *In-vivo*-Versuche eine Superantigenkonzentration von 100 µg/kg bzw. bei einem Gewicht von ungefähr 20 g je Maus 2 µg/Maus gewählt.

3.1.2 Versuchsreihe I

In der ersten Versuchsreihe wurde neben den im Proliferationstest geprüften Superantigenen zusätzlich rekombinantes SPE-G der Gruppe G-Streptokokken verwendet, welches erst zu diesem Zeitpunkt zur Verfügung stand. Alle Superantigene wurden wie in den Methoden (2.2.4) beschrieben rekombiniert in *E. coli* exprimiert und gereinigt.

Injektion der Superantigene sowie des MMC-Fragments erfolgte am 21 Tage nach Arthritisinduktion intravenös (Tab.8). Die ursprüngliche Gelenkschwellung von rund 20 % war zu diesem Zeitpunkt bis auf wenige Ausnahmen vollständig zurückgegangen.

3.1.2.1 Intravenöse Superantigen- / Antigengabe am Tag 21

Für alle Superantigene und das MMC-Fragment konnte von Tag 21 zu Tag 22 eine leichte Gelenkschwellung beobachtet werden (Abb.5 A-E), jedoch lag die Zunahme der Kniedurchmesser nur für SPE-G (6,40 %) deutlich über dem Wert der Kontrollen (2,94 %) die nur PBS erhalten hatten. Auch diese Schwellung erreichte jedoch nicht den Wert von 19,34 %, welcher bei der Arthritisinduktion mit mBSA erzielt wurde (Abb.5 A). Sowohl in der Kontroll- als auch in der SPE-G-Gruppe nahm die Schwellung bis zum Tag 24 kontinuierlich ab, wobei die Werte der Gruppe SPE-G leicht über denen der Kontrolle blieben. Der Schwellungsanstieg in der Gruppe SPE-G war, verglichen mit der Kontrollgruppe, jedoch nicht signifikant, für Tag 22 beträgt $p = 0,092$ (Mann-Whitney-U-Test).

3.1.2.2 Intraartikuläre Superantigen- / Antigengabe am Tag 27

Da der erwartete dramatische Arthritisschub ausblieb, wurde am Tag 27 eine weitere Dosis Superantigene oder MMC-Fragment injiziert. Die Applikation der Antigene erfolgte bei dieser Gabe direkt ins rechte und, zur weiteren Kontrolle, auch ins linke Kniegelenk. Eine Zunahme des rechten Kniegelenks um 7,10 % an Tag 28 konnte bei der Gruppe mit Superantigen-A verzeichnet werden (Abb.9 B).

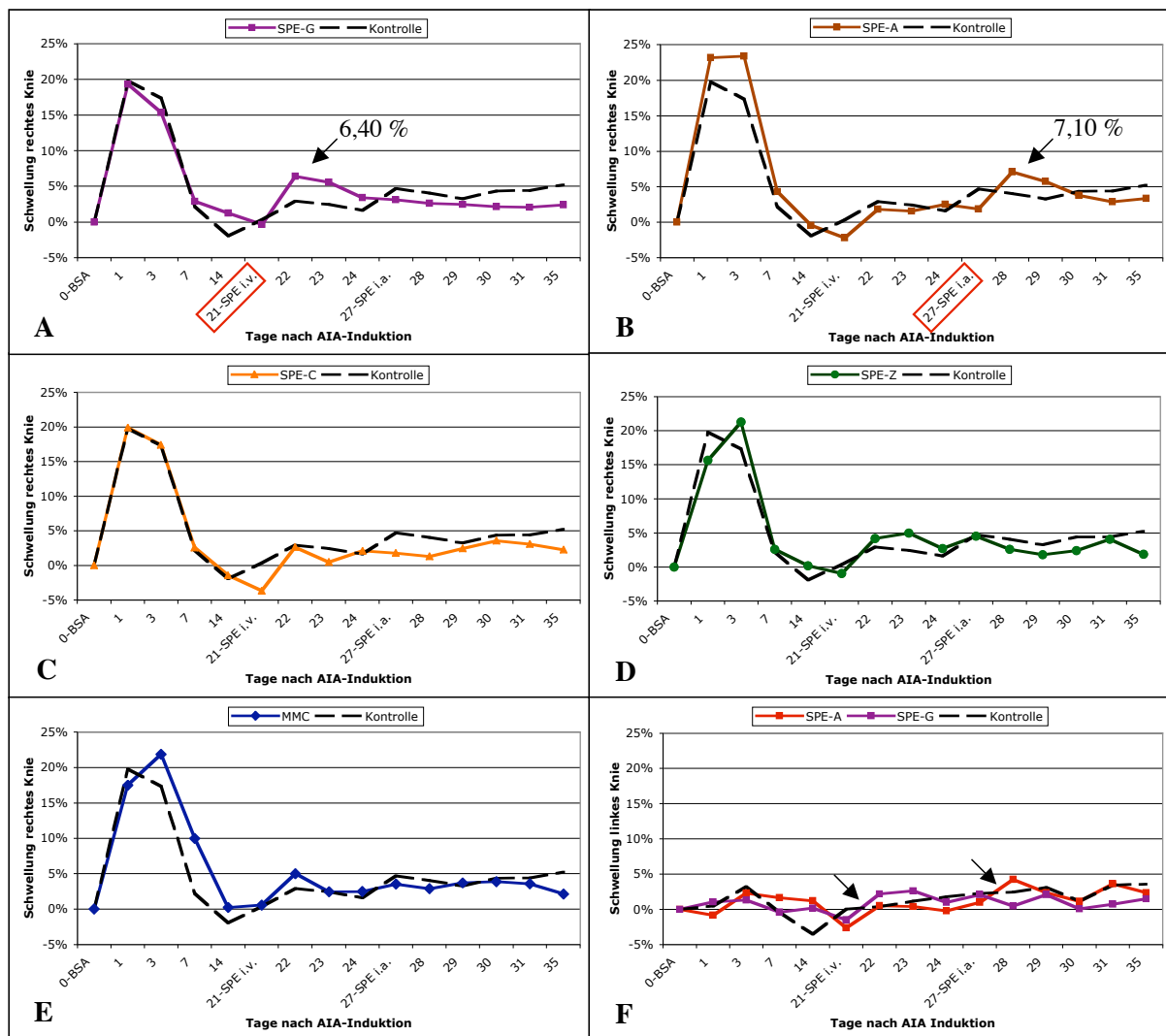


Abb.5: Schwellungskurven der rechten (A-E) und linken Kniegelenke (F). Kasten A und B zeigen den Kurvenverlauf für die Superantigen SPE-G bzw. SPE-A, bei denen eine Reaktion auf das gegebene Superantigene zu erkennen ist. In den linken Knien (F) ist der Einfluss der Superantigene geringer ausgeprägt und eine kontinuierlicher Zunahme des Gelenkdurchmessers sichtbar.

Bei der Kontrollgruppe lag die Schwellung bei 4,08 %. Für alle anderen Gruppen lag der Wert sogar noch unter denen der Kontrollen. Auch dieser Schwellungsunterschied von Gruppe SPE-A zur Kontrollgruppe war mit $p = 0,293$ nicht signifikant. Wobei zu bemerken ist, dass ein deutlicher Unterschied zur Kontrollgruppe nach Betrachtung der Werte am Tage 27 erkennbar war. Während es bei der Kontrollgruppe zu einem Abschwellen kam (4,73 %

auf 4,08 %) war für die SPE-A-Gruppe ein vergleichsweise starker Anstieg von 1,87 % auf 7,10 % zu beobachten.

3.1.2.3 Messungen linke Kniegelenke

In den Kurven der Daten für die linken Kniegelenke (Abb.5 F nur für SPE-G und SPE-A angegeben) fiel ein leichter kontinuierlicher Anstieg auf, der auch in den Kurven für die rechten Kniegelenke zu beobachten und auf das Mäusewachstum zurückzuführen war. Gleichzeitig wurde sichtbar, dass sich die Arthritisinduktion durch mBSA sowie die Reaktivierungsversuche sehr schwach auch im linken Knie bemerkbar machten. Eine systemische Gabe wirkte sich in allen Fällen auch leicht auf das linke Kniegelenk aus. Dies war aber bei intraartikulärer Applikation, trotz Applikation der Antigene in das linke Kniegelenk, nur bei SPE-A zu beobachten. 14 bis 21 Tage nach Arthritisinduktion kam es außerdem sowohl in den rechten als auch den linken Knien zu einem Abschwellen der Kniegelenke auf Werte, die zum Teil unter denen der Ausgangsmessung am Tag 0 lagen.

3.1.2.4 Milzgewichte

Am Tag 35 wurden die Tiere getötet und die Milzen zur weiteren Auswertung gewonnen. Auf eine histologische Untersuchung der ebenfalls gewonnenen Kniegelenke wurde wegen der großen Homogenität der Gruppen nach Auswertung einiger Probeschnitte verzichtet.

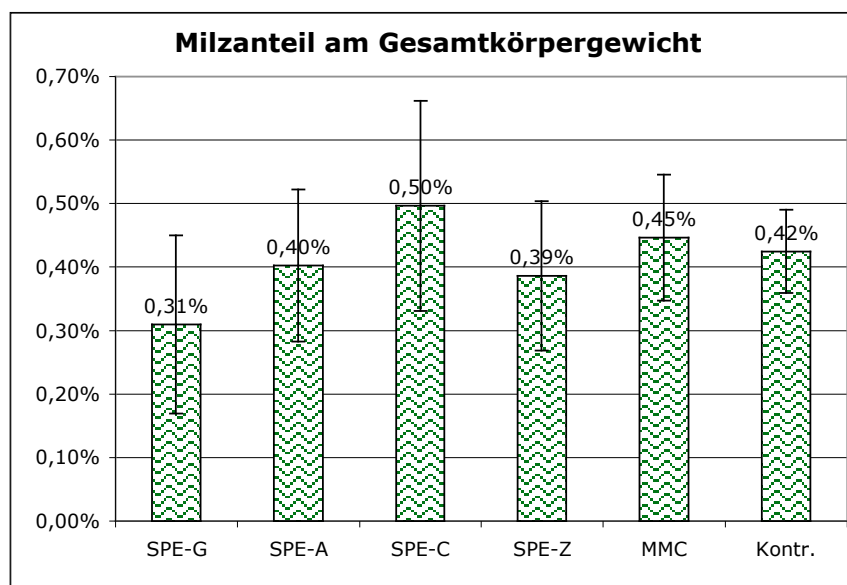


Abb.6: Prozentualer Anteil der Milzgewichte am Gesamtkörpergewicht für die einzelnen Gruppen

Der Anteil des Milzgewichts am Gesamtkörpergewicht der Mäuse zum Tag 35 betrug zwischen 0,31 % und 0,50 % (Abb.6). Schwerer als die Milzen der Kontrollgruppe (0,42 %)

waren nur die Milzen der Gruppe MMC (0,45 %) und SPE-C (0,50 %). Die Gruppe SPE-G wies mit 0,31 % den kleinsten Milzanteil auf.

Bei der Berechnung dieser Mittelwerte wurden die Werte von drei Mäusen (zwei aus Gruppe MMC, eine aus Gruppe SMEZ) nicht mit einbezogen, da diese Mäuse starke Wunden und Entzündungen an der rechten Flanke aufwiesen, welche sie sich vermutlich durch das Aufknabbern der bei dem AIA-Modell unter Umständen entstehenden Granulome zugezogen hatten und dadurch extrem erhöhte Milzgewichte (1,96 % - 1,99 %) aufwiesen.

3.1.3 Versuchsreihe II

Versuchsreihe II und III wurden parallel durchgeführt, um die Wirkung eines ausgewählten Superantigens in verschiedenen Konzentrationen und in verschiedenen Applikationsarten (i.a. Versuchsreihe II, i.v. Versuchsreihe III) zu testen. Aufgrund der Versuchsreihe I, in der das Superantigen SPE-G die stärkste Schwellung auslöste (Abb.5), wurde selbiges zur weiteren Untersuchung ausgewählt. Als Injektionszeitpunkt wurde Tag 7 nach Arthritisinduktion gewählt, um durch die Wahl eines frühen Zeitpunkts der chronischen Phase eine unnötige Belastung der Mäuse durch weitere Kniegelenksmessungen, die unter Äthernarkose durchgeführt wurden, zu vermeiden, obwohl die Restschwellung der rechten Kniegelenke zu diesem Zeitpunkt noch 5 % - 10 % über dem Ausgangswert lag.

Drei Mäuse (je eine Maus pro Gruppe) wurden aus der Auswertung der Versuchsreihe II ausgeschlossen, da die histologischen Befunde extreme Abweichungen zum Rest der Gruppe aufwiesen, die in einem Fall auf eine abszedierende Entzündung zurückzuführen war. In 2 Fällen konnte die Ursache für die abweichenden Werte nicht bestimmt werden. Der Ausschluss dieser drei Fälle hatte nur für die Beurteilung des Arthritisindex Konsequenzen, alle anderen Daten wurden in ihrer Aussage und Signifikanz nicht entscheidend verändert.

3.1.3.1 Superantigengabe Tag 7

Nach der intraartikulären Injektion des Superantigens SPE-G konnte für die Gruppe mit 20 µg SAG pro Maus eine signifikante ($p = 0,002$) Zunahme der Gelenkschwellung im rechten Knie gemessen werden (Abb.7 A). Die Schwellung stieg dabei von 5,82 % auf 20,45 %, fiel aber sehr schnell, innerhalb von 2 Tagen, auf 5,83 % zurück. Im Gegensatz zu der Kontrolle, bei der die Schwellung von 7,10 % an Tag 7 auf 5,33 % an Tag 8 leicht fiel, blieb die Schwellung der Gruppe 2 µg SPE-G pro Maus mit 5,26 % (Tag 7) und 5,46 % (Tag 8) nahezu konstant.

In den linken Kniegelenken (Abb.7 B) zeigte sich die bereits in der Versuchsreihe I bemerkte leichte Tendenz einer Schwellungszunahme, die für die Kontrollen 4,15 %, für die Superantigen-gruppen jedoch nur 2,31 % (2 µg) und 0,76 % (20 µg) betrug. Einen Einfluss der Superantigengabe auf das linke Kniegelenk bestätigte sich in diesem Versuch nicht.

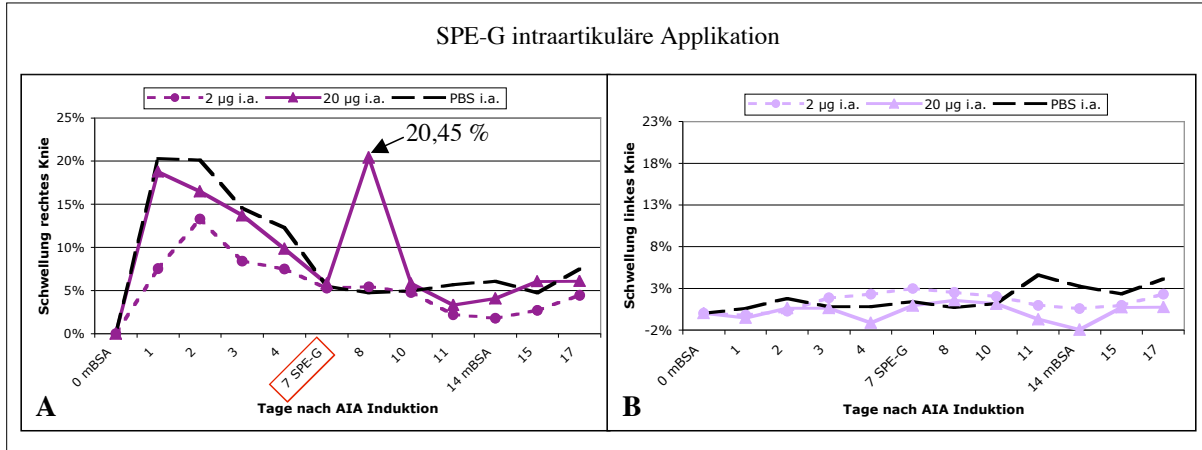


Abb.7: Kurvenverlauf der Knieschwellung nach intraartikulärer SPE-G Injektion für das rechte (A) und das linke Kniegelenk (B).

3.1.3.2 Histologische Auswertung

Ein Teil der Mäuse wurde an Tag 10 getötet um einen Einblick in die histologischen Auswirkungen einer möglichst noch akuten Reaktivierung zu erhalten. Der Rest der Mäuse wurde bis Tag 21 weiterbeobachtet.

Der histologische Arthritisindex wurde durch die Auswertung der unter Material und Methoden in Tabelle 9 beschriebenen Kriterien ermittelt. Destruktionen wurden in keinem Fall registriert.

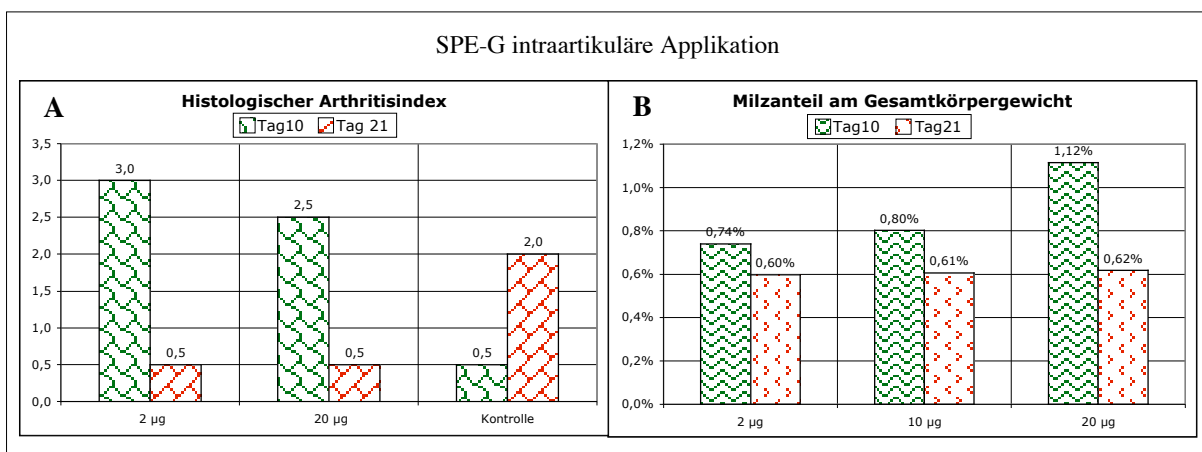


Abb.8: A: Arthritisindex nach histologischer Bewertung der Kniegelenke
 B: Prozentualer Anteil des Milzgewichts am Gesamtkörpergewicht zum Versuchsende (Tag 10 oder 21)
 In beiden Abbildungen wurden die Standardabweichungen nicht angegeben, diese sind in Tabelle 10 zu finden

Für den Tag 10 ergab sich der höchste Arthritisindex für die Gruppe 2 µg SPE-G mit 3,0. Es folgte die Gruppe 20 µg SPE-G mit 2,50 und die Kontrollen mit einem Wert von 0,5. Am Tag 21 waren die Verhältnisse umgekehrt und die Kontrollen wiesen mit 2,0 den höchsten Index auf, während beide Superantigengruppen auf einen Wert von 0,5 sanken. Weder an Tag 10 noch an Tag 21 waren die in den Gruppen gemessenen Unterschiede signifikant ($p \geq 0,076$) (Abb.8 A).

3.1.3.3 Milzgewichte

Die an den Tagen 10 bzw. 21 entnommenen Milzen hatten einen deutlich größeren Anteil am Gesamtkörpergewicht als in Versuchsreihe I. Der Anteil bewegte sich zwischen 0,60 % und 1,12 % (Abb.8 B). Für alle drei Gruppen konnte eine Massenreduktion von Tag 10 auf Tag 21 beobachtet werden. Die Gruppe mit 20 µg SPE-G schwankte zwischen 0,76 % am Tag 10 und 0,70 % am Tag 21. Die Milzgröße nahm in der Gruppe mit 2 µg Superantigen von 0,80 % auf 0,60 % deutlich stärker ab, blieb aber immer noch unter der Differenz, die von den Kontrollen mit einem Abfall von 1,07 % auf 0,62 % erreicht wurde. Anders als bei der Versuchsreihe I wiesen die Mäuse mit einem hohen Milzanteil hier keine Verletzungen oder sonstigen sichtbaren Erkrankungen auf. Signifikante Unterschiede bestanden sowohl für Tag 10 zwischen Kontrollen und Superantigengruppen (für 2 µg $p = 0,050$, für 20 µg $p = 0,034$) als auch innerhalb der Kontrollgruppe (für Tag10 / Tag21 $p = 0,037$).

Tab.10 Messdaten der Versuchsreihe II mit Standardabweichungen

	Schwellung rechtes Kniegelenk		Arthritisindex		Milzgewicht	
	Tag 7	Tag 8	Tag 10	Tag 21	Tag 10	Tag 21
2 µg SPE-G	5,26 % \pm 0,03	5,46 % \pm 0,03	3,0 \pm 2,2	0,5 \pm 0,5	0,74 % \pm 0,0006	0,60 % \pm 0,0008
20 µg SPE-G	5,82 % \pm 0,05	20,45 % \pm 0,09	2,5 \pm 2,0	0,5 \pm 0,0	0,80 % \pm 0,0008	0,61 % \pm 0,0014
Kontrolle	5,48% \pm 0,07	4,73 % \pm 0,04	0,5 \pm 0,0	2,0 \pm 1,0	1,12 % \pm 0,0015	0,62 % \pm 0,0004

3.1.4 Versuchsreihe III

In Versuchsreihe III erfolgte die Gabe von 2, 10 bzw. 20 µg SPE-G intravenös am 7. Tag nach Auslösen der Antigen-induzierten Arthritis. Da nach der Superantigengabe, keinerlei Wirkung auf die Kniegelenksgröße sichtbar war, wurde am Tag 14 eine weitere Dosis mBSA gegeben, um eine mögliche Verstärkung der Arthritisreaktion nach erneuter Antigenexposition zu überprüfen.

Auch in dieser Versuchsreihe wurde eine Maus (Gruppe 10 µg SPE-G je Maus) wegen starken Abweichungen vom Rest der Gruppe in der histologischen Beurteilung aus der

Auswertung genommen, ohne dass die Ursachen für diese starke Abweichung gefunden werden konnte.

3.1.4.1 Superantigengabe Tag 7

Nach der Superantigengabe an Tag 7 konnte am Tag 8 keine Zunahme der Schwellungen, sondern in allen Gruppen einschließlich der Kontrolle nur eine weitere Abnahme der Knieschwellung beobachtet werden (siehe Abb.9), wobei zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede auftraten. Der größte Unterschied zur Kontrollgruppe bestand für die Gruppe 10 μg SPE-G pro Maus mit $p = 0,378$, der geringste für die Gruppe 2 μg SPE-G mit $p = 1,000$.

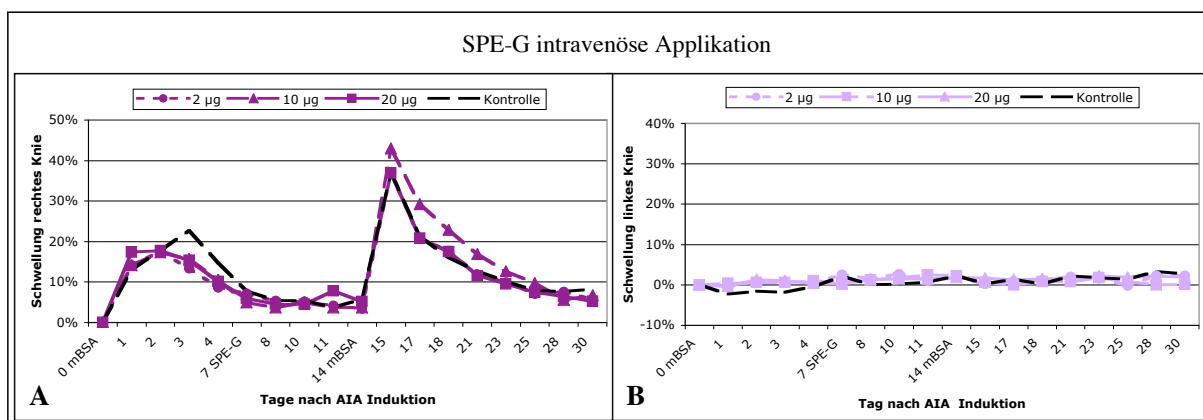


Abb.9: Kurvenverlauf der Knieschwellung nach intravenöser SPE-G Injektion für das rechte (A) und das linke Kniegelenk (B).

3.1.4.2 mBSA-Gabe Tag 14

Am Tag 14 wurde ein weiterer Arthritisschub durch intraartikuläre mBSA-Gabe ausgelöst. Zu Tag 15 erfolgte daraufhin eine enorme Zunahme der Schwellung (Gruppe mit 2 μg SPE-G 36,97 %, 10 μg SPE-G 42,96 %, die Gruppe mit 20 μg 36,90 % und Kontrollen 37,14 % zu Tag 0), die den Anstieg von Tag 0 auf Tag 1 in allen Gruppen um mehr als das Doppelte überstieg (Abb.9 A). Signifikante Unterschiede ließen sich jedoch auch hier nicht einmal für die Gruppe 10 μg SPE-G mit dem größten Schwellungsanstieg feststellen ($p = 0,465$).

In den linken Kniegelenken wurden außer der leichten grundsätzlichen Größenzunahme keinerlei Auffälligkeiten bemerkt (Abb.9 B)

3.1.4.3 Histologische Auswertung

Wie auch schon für Tag 21 der Versuchsreihe II wurde der höchste Arthritisindex mit 2,10 von der Kontrollgruppe erreicht, dicht gefolgt von 2,08 für 2 μg SPE-G. Mit zunehmender Superantigenkonzentration fiel der Arthritisindex weiter und betrug bei 20 μg nur noch 0,83

(Abb.10 A). Aufgrund der relativ kleinen Gruppengrößen und der hohen Standardabweichungen unterschieden sich diese Werte jedoch nicht signifikant von den Kontrollen (Tab.11) ($2\ \mu\text{g}$ $p = 0,712$, $10\ \mu\text{g}$ $p = 0,576$, $20\ \mu\text{g}$ $p = 0,337$).

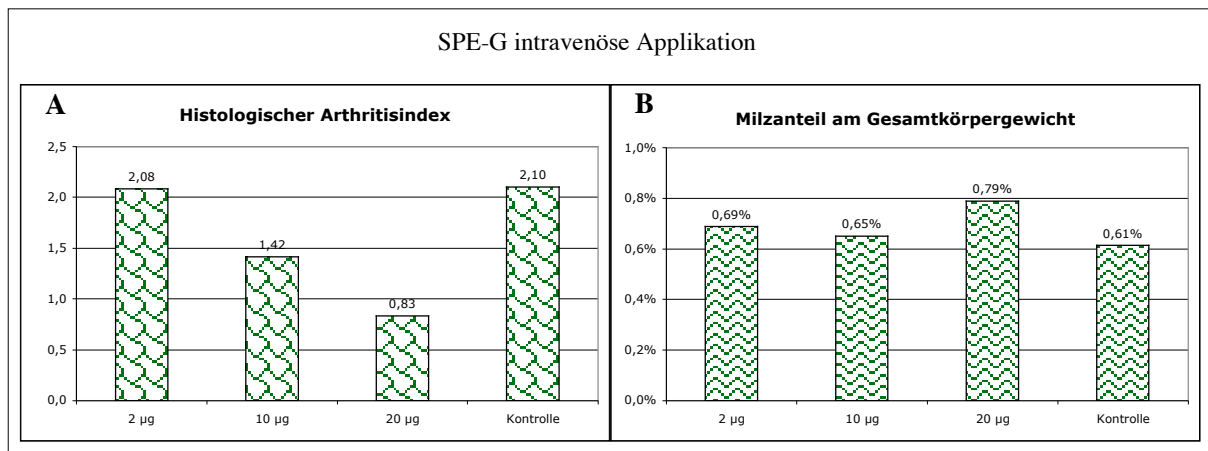


Abb.10: A: Arthritisindex nach histologischer Bewertung der Kniegelenke
 B: Prozentualer Anteil des Milzgewichts am Gesamtkörpergewicht zum Versuchsende
 In beiden Abbildungen wurden die Standardabweichungen nicht angegeben, diese sind in Tabelle 11 zu finden.

3.1.4.4 Milzgewichte

Die Milzgewichte hatten durchschnittlich einen prozentualen Anteil am Gesamtgewicht von 0,68 % (Abb.10 B). Diese Werte lagen höher als jene in der Versuchsreihe I. waren aber vergleichbar mit den Werten der Versuchsreihe II am Tag 21. Die Gruppe $20\ \mu\text{g}$ SPE-G hatte mit 0,79 % den größten Milzanteil und unterschied sich mit $p = 0,022$ damit auch signifikant von der Kontrollgruppe mit den durchschnittlich kleinsten Milzen (0,61 %) in dieser Versuchsreihe.

Tab.11 Messdaten der Versuchsreihe III mit Standardabweichungen

	Schwellung rechtes Kniegelenk					Arthritisindex Tag 30	Milzgewicht Tag 30
	Tag 1	Tag 7	Tag 8	Tag 14	Tag 15		
2 µg SPE-G	14,18 % ± 0,07	7,10 % ± 0,04	5,33 % ± 0,02	3,45 % ± 0,01	36,97 % ± 0,07	2,1 ± 1,7	0,69 % ± 0,0008
10 µg SPE-G	14,13 % ± 0,08	4,87 % ± 0,05	3,68 % ± 0,04	3,71 % ± 0,02	42,96 % ± 0,14	1,4 ± 1,1	0,65 % ± 0,0017
20 µg SPE-G	17,43 % ± 0,08	5,95 % ± 0,02	4,73 % ± 0,03	5,15 % ± 0,02	36,90 % ± 0,15	0,8 ± 0,6	0,79 % ± 0,0014

3.1.5 Versuchsreihe IV

Versuchsreihe IV diente der Verifizierung der in Versuchsreihe II erhaltenen Ergebnisse und untersuchte des weiteren den Einfluss von SPE-G auf nicht-arthritische Mäusegelenke. Dazu wurden in einer Gruppe nach normaler Immunisierung der Mäuse mit mBSA und *Mycobacterium tuberculosis* auf ein Auslösen der Arthritis am Tag 0 durch mBSA-Gabe ins rechte Knie verzichtet (Gruppe -BSA/+SPE-G). Gleiches geschah mit einer Kontrollgruppe, die am Tag 7 jedoch kein Superantigen erhielt (-BSA/-SPE-G).

Die Arthritisinduktion in der Gruppe +BSA/+SPE-G war in diesem Versuch aus ungeklärten Gründen nicht so erfolgreich wie jene der Vorversuche. Es wurden bei dieser Versuchsreihe durchschnittlich nur Knieschwellungen von 11 % über dem Ausgangswert Tag 0 erreicht.

Da die in Versuchsreihe II beobachtete Kniegelenkschwellung nach Superantigengabe an Tag 7 sehr schnell wieder abgeklungen war, wurden in Versuchsreihe IV an Tag 8 zwei Messungen im Abstand von 6 Stunden durchgeführt.

3.1.5.1 Superantigengabe Tag 7

Bei der ersten Messung nach SPE-G Gabe an Tag 8 wurde in den Gruppen mit Superantigen unabhängig vom Arthritisstatus eine Schwellung der rechten Kniegelenke beobachtet (Abb.11 A), wobei der Anstieg der nicht arthritischen Gruppe (-BSA/+SPE-G) mit 18,5 % etwas stärker ausfiel als der der Gruppe mit Arthritisinduktion (+BSA/+SPE-G mit 16,19 %). Dieser Unterschied in den Gruppen +BSA/+SPE-G und -BSA/+SPE-G war aber nicht signifikant. Beide Gruppen unterschieden sich jedoch signifikant von der Kontrollgruppe ohne Arthritisinduktion und ohne Superantigengabe, die am Tag 8 eine schwache Schwellung von 3,73 % aufwies (für +BSA/+SPE-G $p = 0,006$ und für -BSA/+SPE-G $p = 0,009$). Diese Schwellung innerhalb der Kontrollgruppe -BSA/-SPE-G ist wahrscheinlich auf Reizungen durch die Injektion von PBS in das Kniegelenk zurückzuführen. Innerhalb von 6 Stunden ging die Schwellung der Kniegelenke in allen Gruppen um rund ein Viertel zurück.

Bis auf eine leicht ansteigende Kniegröße wurden an den linken Kniegelenken keine weiteren Besonderheiten beobachtet (Abb.11 B).

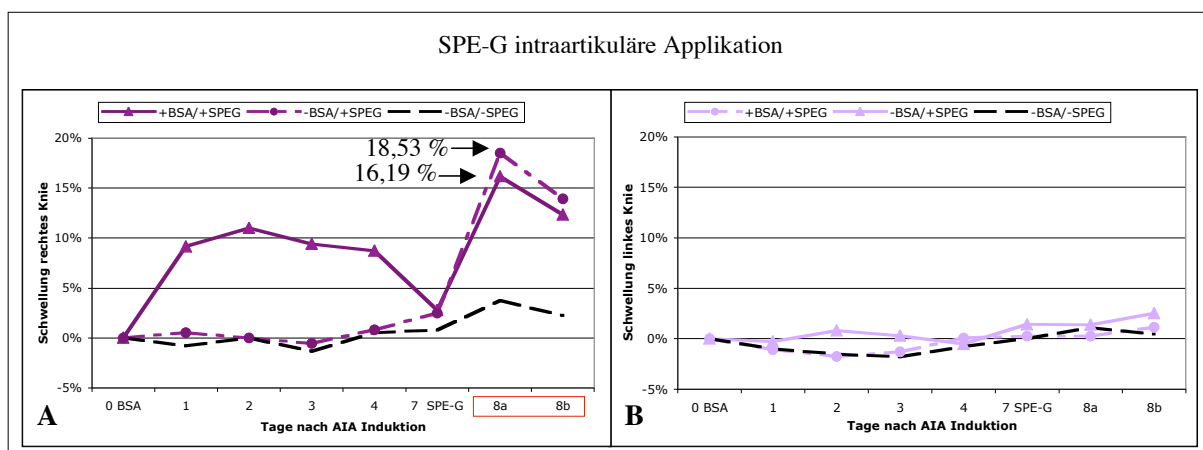


Abb.11: Kurvenverlauf der Knieschwellung nach intraartikulärer SPE-G Injektion für das rechte (A) und das linke Kniegelenk (B). Die Messungen 8a und 8b liegen 6 Stunden auseinander.

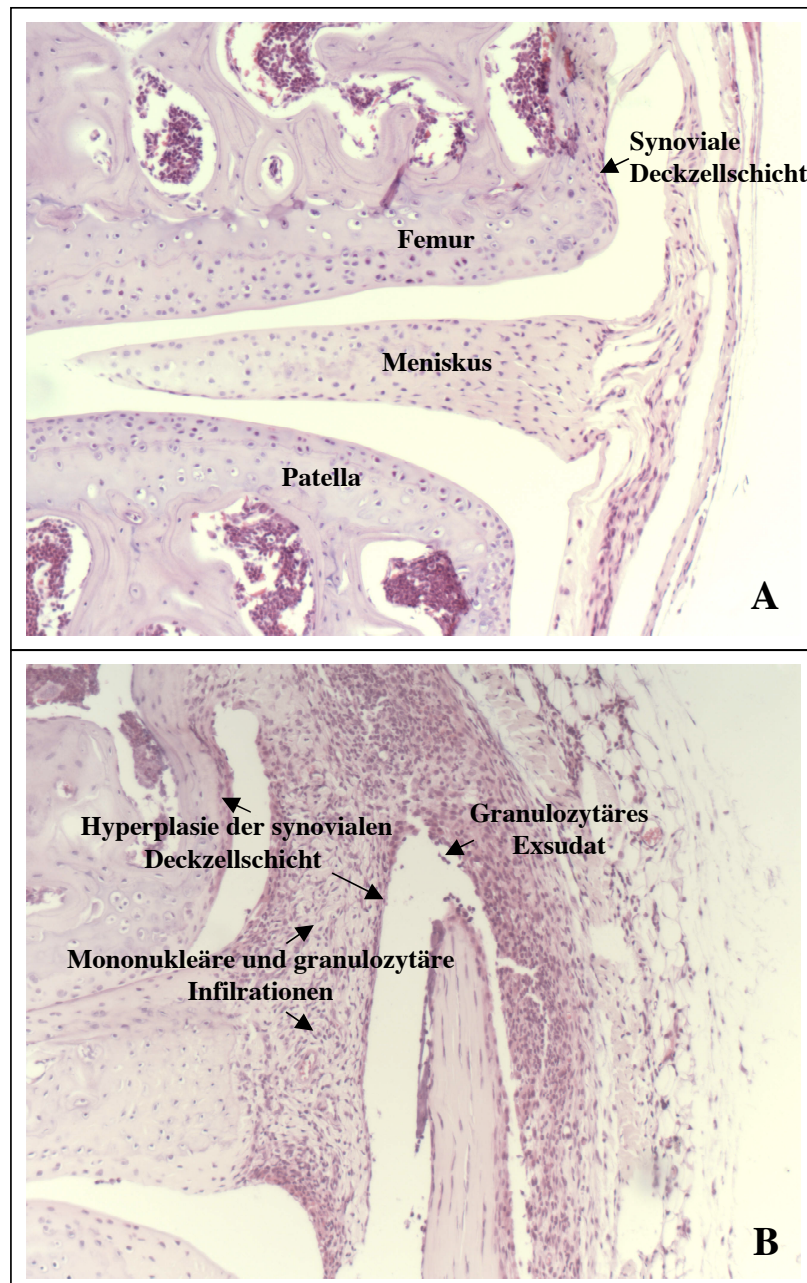


Abb.12: Histologie von Kniegelenken einer Maus der Gruppe +BSA/+SPE-G
 A: nicht-arthritischen linken Kniegelenks mit Femur, Tibia und Meniskus.
 B: arthritisches rechtes Kniegelenk. Neben deutlichen unterschiedlich starken Infiltraten in Meniskus und Synovialmembran ist im Gelenkspalt vereinzelt Exsudat zu erkennen.

3.1.5.2 Histologie

Wie erwartet wies die Gruppe +BSA/+SPE-G mit 3,67 den höchsten, die Gruppe –BSA/–SPE-G mit 0,83 Punkten den niedrigsten Arthritisindex auf (Abb.12 und 13 A). Die Gruppe –BSA/+SPE-G kam auf einen Index von 2,40. Betrachtet man den Gesamtarthritisisindex bestand zwischen den Gruppen mit Superantigengabe (+BSA/+SPE-G und –BSA/+SPE-G) kein signifikanter Unterschied ($p = 0,164$), da die Zeichen einer akuten Arthritis in beiden Gruppen sehr prominent waren. Jedoch unterschieden sie sich signifikant im Index für die

Zeichen einer chronischen Arthritis ($p = 0,047$). Umgekehrt verhielt es sich bei dem Vergleich der nicht AIA induzierten Gruppen, hier war ein signifikanter Unterschied im Gesamtarthritisindex vorhanden ($p = 0,023$), welcher sich ausschließlich auf die Unterschiede im akuten Index zurückführen lässt. Die Gruppen +BSA/+SPE-G und -BSA/-SPE-G unterschieden sich sowohl im Gesamt- ($p = 0,037$) als auch im chronischen und akuten Arthritisindex signifikant.

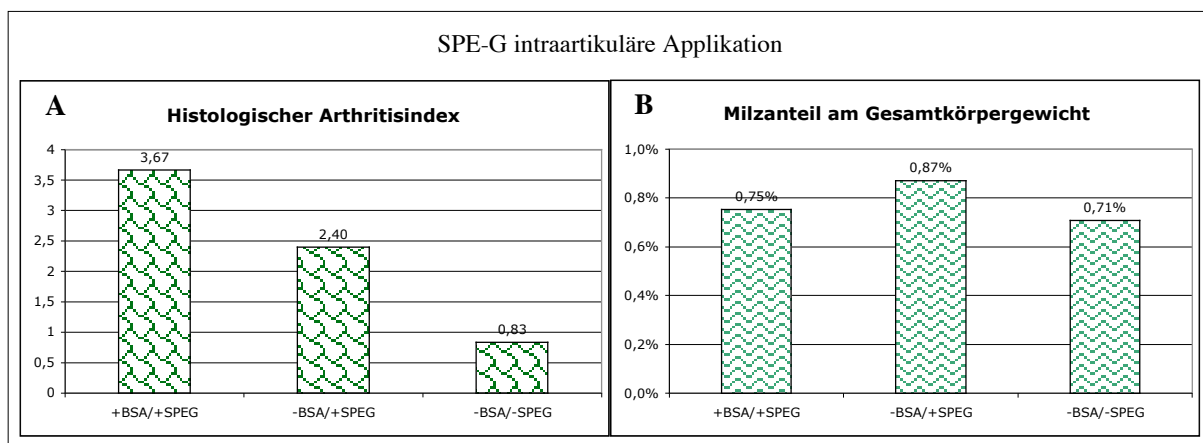


Abb.13: A: Arthritisindex nach histologischer Bewertung der Kniegelenke
B: Prozentualer Anteil des Milzgewichts am Gesamtkörpergewicht zum Versuchsende
In beiden Abbildungen wurden die Standardabweichungen nicht angegeben, diese sind in der Tabelle 12 zu finden.

3.1.5.3 Milzgewichte

Der Milzanteil am Gesamtkörpergewicht schwankte zwischen 0,71 % (-BSA/-SPE-G) und 0,87 % (-BSA/+SPE-G) (Abb.13 B) und lag damit in der Nähe der Werte, welche für Versuchsreihe II Tag 10 registriert wurden (Abb.8 B). Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen ergaben sich nicht.

Tab.12 Messdaten der Versuchsreihe IV mit Standardabweichungen

i.a. SPE-G Gabe	Schwellung rechtes Kniegelenk		Arthritisindex			Milzgewicht Tag 8b
	Tag 7	Tag 8a	akut	chronisch	gesamt	
+BSA/+SPE-G	2,77 % \pm 0,04	16,19 % \pm 0,04	1,5 \pm 1,0	2,2 \pm 0,8	3,6 \pm 1,8	0,75 % \pm 0,0010
-BSA/+SPE-G	2,49 % \pm 0,02	18,53 % \pm 0,01	1,2 \pm 0,4	1,2 \pm 0,3	2,4 \pm 0,4	0,87 % \pm 0,0026
-BSA/-SPE-G	0,75 % \pm 0,01	3,73 % \pm 0,02	0,0 \pm 0,0	0,8 \pm 0,6	0,8 \pm 0,6	0,71 % \pm 0,0018

Die Zeiten 8a und 8b liegen 6 Stunden auseinander.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse dieser 4 Versuchsreihen drauf hin, dass das SPE-G in der Lage ist, im vorgeschädigten, aber auch im gesunden Mäuseknie einen sofortigen kurzen Arthritisschub auszulösen. Des weiteren scheint sich eine durch SPE-G-Gabe induzierte Reduktion der histologischen Arthritiszeichen im weiteren Krankheitsverlauf anzudeuten.

3.2 Antikörper gegen kreuzreaktive Strukturen

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Verteilung verschiedener Antikörper gegen kreuzreaktive Strukturen und Epitope in Rheuma- und Kontrollseren. Diese Untersuchungen dienten einem besseren Verständnis der Bedeutung dieser Antikörper bei der Entstehung der Rheumatoiden Arthritis.

Einteilung der Seren

Die gesammelten Seren wurden, wie unter Material und Methoden beschrieben, in Rheumaseren und Kontrollseren eingeteilt. Rheumaseren wurden dabei durch rheumatische Beschwerden und einen vorhandenen Rheumatiter von 1/256 definiert. Alle Kontrollseren stammten von Personen ohne rheumatische Erkrankungen. Rheumafaktoren wurden in diesen Seren nicht nachgewiesen. Insgesamt wurden 235 Seren von Rheumapatienten und 104 Seren von Kontrollen ohne rheumatische Beschwerden untersucht.

Nachweis von Antikörpern gegen zyklisch citrulliniertes Peptid (CCP)

Zusätzlich wurden die Seren mit einem kommerziellen Kit auf Antikörper gegen zyklisch citrulliniertes Peptid untersucht. Dieser Test dient ebenfalls der Rheumadiagnostik. Antikörper gegen das Peptid wurden in 69,79 % der Rheumaseren und 1,25 % der Kontrollseren gefunden. Obwohl Antikörper gegen CCP nur bei gut 2/3 der Rheumatiker nachgewiesen wurden, korrelierten dieser Test und die Einteilung nach Krankheitsbild und Rheumafaktor hochsignifikant ($p < 0,001$) miteinander. Der Korrelationskoeffizient betrug 0,597.

Für die weiteren Untersuchungen wurde die Einteilung in Rheuma- und Kontrollseren anhand von rheumatischen Beschwerden und Rheumafaktor beibehalten. In Fällen, bei denen die Ergebnisse des CCP-ELISAs zugrundegelegt wurden, wird darauf an entsprechender Stelle gesondert hingewiesen.

3.2.1 Nachweis kreuzreaktiver Antikörper gegen das Motiv DIMRLREKLQ aus Humanvimentin und aus dem M-Protein von Gruppe C-Streptokokken (MMC)

In der Arbeit von Geyer *et al.* 1999 wurden im MMC-Protein 3 Heptadeinheiten identifiziert, die in ihrer Struktur dem coiled-coil DIMRLREKLQ Motiv im Vimentin (Aminosäuren 181 – 190) ähneln (siehe auch Einleitung Tab.3). Diese Epitope könnten bei einer Infektion mit Gruppe C-Streptokokken zur Bildung von Antikörpern führen, die sowohl das M-Protein als

auch Vimentin angreifen. Durch das Auslösen dieser gegen das Knorpelprotein gerichteten pathologischen Prozesse könnte das Epitop DIMRLRKLQ bei der Entstehung der Rheumatoiden Arthritis von Bedeutung sein.

Hier untersuchten wir nun das Vorkommen von Antikörpern gegen entsprechende Abschnitte des MMCs und Vimentins in Rheuma- und Kontrollseren, um zu einer Aussage über den Zusammenhang des Auftretens dieser Antikörper und der RA zu gelangen.

3.2.1.1 Streptavidin ELISA

Die 2 Motive des M-Proteins der GCS mit der größten Übereinstimmung, MMC Motiv 2 (AS 96 – 105) und MMC Motiv 3 (AS 135 – 144), wurden in einer Länge von 21 Aminosäuren (Motiv 2, 90-100 und Motiv 3, 129-149) synthetisiert, biotinyliert und über Streptavidin an Mikrotiterplatten gebunden (2.4.4.1). In gleicher Weise wurde mit dem Vimentin Motiv (AS 175-195) verfahren. Wie unter Material und Methoden beschrieben, wurden anschließend Seren von Rheumapatienten und Kontrollen ohne rheumatische Beschwerden auf kreuzreaktive Antikörper untersucht.

Nach der Analyse von rund 100 Seren fiel auf, dass die gemessenen Optischen Dichten (OD) für die drei unterschiedlichen Peptide kaum voneinander abwichen. Dies war sowohl in den Patienten-, als auch in den Kontrollseren der Fall und wich von der Hypothese ab, nach der davon ausgegangen wurde, dass bei Rheumatikern kreuzreaktive Antikörper häufiger als in Kontrollen vorkommen. Unabhängig davon war auch kein so häufiges Auftreten (mehr als 70 %) von Kreuzreaktionen zu erwarten. Derart häufige, ähnliche OD-Werte, auch in Seren von Nichtrheumatikern weisen auf unspezifische Antikörperbindung hin.

Um diese Möglichkeit zu testen, wurden Streptavidinplatten mit Biotin überschichtet und anschließend, ohne die Zugabe der synthetischen Peptide, wie gewohnt mit Seren und sekundärem Antikörper inkubiert. Die auf diesen Platten gemessenen Werte zeigten ebenfalls eine hohe OD, die den Werten der entsprechenden Peptidplatten in etwa entsprach. Diese Ergebnisse deuteten eine unspezifische Reaktion der Humanseren mit Streptavidin an. Im Westernblot wurde diese Möglichkeit überprüft. Geblockte Nitrozellulosemembranstreifen mit Streptavidin wurden entweder direkt oder nach einer Inkubation mit Biotin oder den Peptiden mit Seren inkubiert. Bei dieser Untersuchung ließen sich in allen getesteten Humanseren sowie auch in einem von 2 Kaninchenseren (mit spezifischen Antikörpern gegen Teile des MMC) Antikörper gegen Streptavidin nachweisen. Die unspezifische Bindung von Antikörpern an Streptavidin ließ sich auch durch die Verwendung von rekombinantem

Streptavidin, Preinkubation von Serum und Peptid vor dem Aufbringen auf die Streptavidinplatte oder einer erhöhten Peptidkonzentration nicht eliminieren, so dass auf den Nachweis peptidspezifischer Antikörper verzichtet werden musste.

3.2.1.2 Herstellung rekombinanter Vimentin- und MMC-Protein-Fragmente

Da es wegen des hohen Hintergrunds nicht möglich war, spezifische Antikörper gegen die strukturgleichen Peptide von Vimentin und MMC nachzuweisen, wurden längere, rekombinante Fragmente beider Proteine zur Testung im ELISA hergestellt. Für beide Proteine wurden die Fragmente so gewählt, dass die vermuteten kreuzreaktiven Epitope (DIMRLREKLQ für Vimentin) eingeschlossen waren (Abb.13).

Tab.13: Proteinsequenzen der rekombinanten Proteinfragmente

<u>rekombinantes Vimentin-Fragment</u>						
1	MVANYIDKVR	FLEQQNKILL	AELEQLKGQG	KSRLGDLYEE	EMRELRRQVD	QLTNDKARVE
71	VERDNLAE DI	MRLREKLQEE	MLQREEAENT	LQSFRQDVDN	ASLARLDLER	KVESLQEEIA
141	FLKKLHEEEI	QELQAQIQEQ	HVQIDVDVSK	PDLTAALRDV	RQQYESGSHH	HHHH
<u>rekombinantes MMC-Fragment</u>						
1	MGSMEVSGQS	IEVTHIKPEE	GLTVVT DSD	ILKEKLSKIE	EEHDLLOAKI	EKKEG DISDL
71	KEKLQ NLKDD	KSLAEAGYAN	SYKHHQEQLA	EKDK DISDLK	EKLQ NLKDDK	SLAEAGYANS
141	YKHHQEQLAE	KDKLNAEKDD	QIKQLEGSRS	HHHHHH		

Das MMC-Fragment enthielt neben den bereits im Streptavidin-ELISA untersuchten Motiven 2 und 3 auch das stärker abweichende Motiv 1. Die notwendigen Primer wurden mit Hilfe der unter Accessionnummer X56134 für Vimentin (Honore *et al.*, 1990) und X93464 für MMC (Geyer *et al.*, 1999) beschriebenen Nucleotidsequenzen erstellt und entsprechend mit Vim.fw, Vim.rv beziehungsweise MMC.fw und MMC.rv bezeichnet (siehe Material und Methoden). Für Vimentin wurde eine Sequenz von 498 Basenpaaren (381-878) amplifiziert. Das Fragment wurde über die durch den Primer angefügten Schnittstellen NcoI und BamHI in den Vektor pQE60 kloniert. In diesem Vektor wird an das klonierte Protein C-terminal ein Histidinhexamer angehängt. Die mit den Primern MMC.fw und MMC.rv vervielfältigte MMC-Sequenz war 435 Basenpaare groß (185-619) und wurde ebenfalls über NcoI und BamHI vor das Histidinhexamer eines pQE60 Vektors kloniert. Der dabei klonierte Bereich enthielt alle 3 dem Vimentinmotiv ähnliche Sequenzen. Diese rekombinanten Proteinfragmente wurden im weiteren einfach als Vimentin und MMC bezeichnet. Die Reinigung der rekombinanten Proteine erfolgte durch Bindung an Nickelagarose. Die Fragmente wurden mit Hilfe eines Harnstoffpuffers bei pH 5,9 für Vimentin und pH 4,5 für

MMC eluiert. Dieser Affinitätschromatographie folgte eine weitere Reinigung mittels Ionenaustauschchromatographie (Vimentin pI = 4,89, MMC pI = 5,35).

Das gereinigte rekombinante Vimentinfragment hatte eine Größe von ca. 24 kD und lief in SDS-Gelen mit einer Doppelbande. Für das MMC-Fragment ergab sich ein Molekulargewicht von 31 kD. Die zu erwartende Größe lag nach Berechnungen bei nur 17,8 kD, Ursache hierfür könnte das dominierende Auftreten von MMC-Dimeren sein. Dafür sprechen ebenfalls die im nächsten Abschnitt diskutierten Westernblots, in denen nach Antikörperbindung auch Proteinschleier in geringeren Molekulargewichten zu erkennen waren (siehe Abb.14).

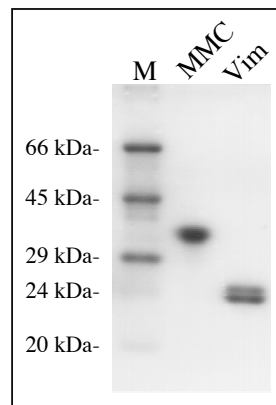


Abb.14: SDS-PAGE Commassie-Blue mit den rekombinanten Fragmenten von MMC (MMC = 31 kD) und Vimentin (Vim = 24 kD), Marker (M)

3.2.1.3 Nachweis von Vimentin- und MMC-Protein-Fragment-Antikörpern

Westernblot

Vor der Untersuchung der Seren im ELISA wurden die rekombinanten Proteine auf Nitrozellulose aufgebracht und nachgewiesen, dass spezifische MMC- bzw. Vimentin-antikörper auch mit dementsprechend anderen Protein kreuzreagieren, gleichzeitig wurden auch einige Humansenen getestet (siehe Abb.15).

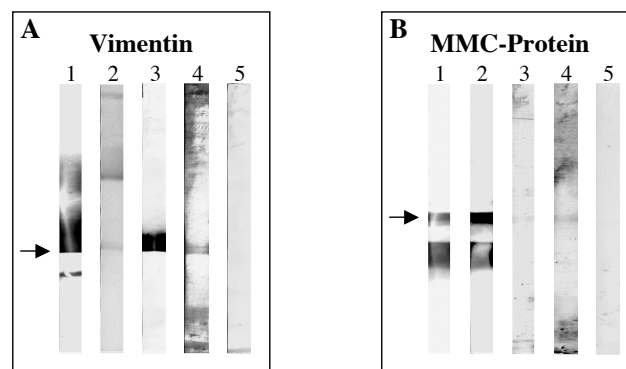


Abb.15: Reaktionen des Vimentinfragments (A) und des MMC-Fragments (B) mit verschiedenen Antikörpern: 1 Anti-Histidin, 2 Anti-MMC (vollständiges Protein), 3 Anti-Vimentin (vollständiges Protein), 4 Rheuma-positives Serum, 5 Rheuma-negatives Serum.

Beide Proteine wurden von Anti-Histidin-Antikörpern sehr gut erkannt. Ähnlich gut wurden die Fragmente von Antikörpern gegen das Ursprungprotein erkannt. Mit Antikörpern gegen das entsprechend andere Protein waren die Fragmente nur noch vergleichsweise schwach nachzuweisen. In dem getesteten Rheumaserum waren sowohl Antikörper gegen MMC als auch gegen Vimentin nachweisbar. Im Kontrollserum war ein solcher Nachweis nicht möglich.

ELISA

Im Anschluss an diese Voruntersuchungen wurden 235 Seren von Patienten mit rheumatischen Beschwerden und Rheumatiter sowie 80 Seren von Rehabilitationspatienten und Sportlern ohne rheumatische Erkrankung im ELISA auf Antikörper gegen die rekombinanten Fragmente gescreent. Die Bestimmung der Titer für Vimentin und MMC-Protein erfolgte wie unter Material und Methoden beschrieben. Jedes Serum wurde doppelt getestet und für die Auswertung der Mittelwert der gemessenen OD gebildet. Von diesem Mittelwert wurde noch der Wert des ebenfalls immer mitgeführten, nicht rheumatischem „Standardserums“ subtrahiert, um einen Vergleich von Werten verschiedener Tage und Platten zu ermöglichen.

Durch Abzug des Standardserums, welches in anfänglichen Untersuchungen niedrigere Titer als getestete Rheumaseren aufwies, im späteren Vergleich zu vielen Kontroll- und einigen Rheumaseren jedoch eine relativ hohen Titer besaß, kam es zu Werten der Optischen Dichte, die im negativen Bereich lagen. Diese „technische Unmöglichkeit“ hat aber keine weitere Bewandnis auf die folgenden Berechnungen, da sie das Verhältnis der gemessenen Wert zueinander nicht beeinflusst.

3.2.1.4 MMC-Protein-Fragment-Antikörper

Die durch Berechnung der Mittelwerte beider Gruppen erhaltenen Kurven verlaufen bis auf geringe Abweichungen bei niedrigen Titerstufen relativ synchron (siehe Abb.16) und zeigen, dass von einer gleichmäßig verteilten Streptokokkeninfektionsrate und Antikörperbildung bei Patienten und Kontrollen ausgegangen werden kann.

Auch die statistische Auswertung mit dem Mann-Whitney-U-Test ergab nur für den Titer 1/20 mit $p = 0,047$ einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Für alle anderen Titerstufen ergaben sich für die Optische Dichte mit $p > 0,110$ keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollen und Patienten

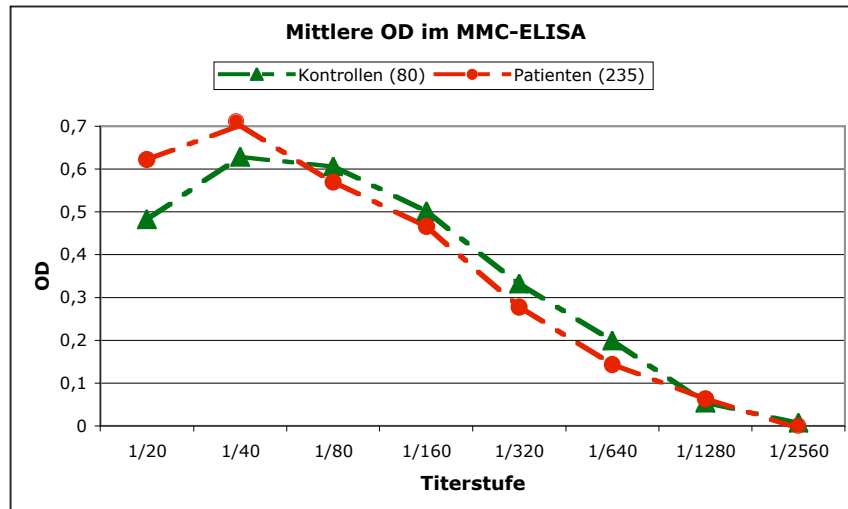


Abb.16: Kurvenverlauf der mittleren Optischen Dichten des MMC-ELISA

Eine weitere Aufteilung der Messdaten in MMC-Antikörper-positive und -negative Seren wurde vorgenommen, dabei wurde der Mittelwert des als Standard auf jeder Platte mitgeführten Serums als Grenzwert angenommen (siehe auch Vimentin). Die Anzahl der positiven Seren schwankt je nach Titerstufe. Die meisten positiven Werte erreichten die Seren in den Titerstufen 1/80 und 1/160, hier haben rund 60 % der Kontrollen und 55 % der Patienten einen positiven MMC-Titer (siehe Abb.17).

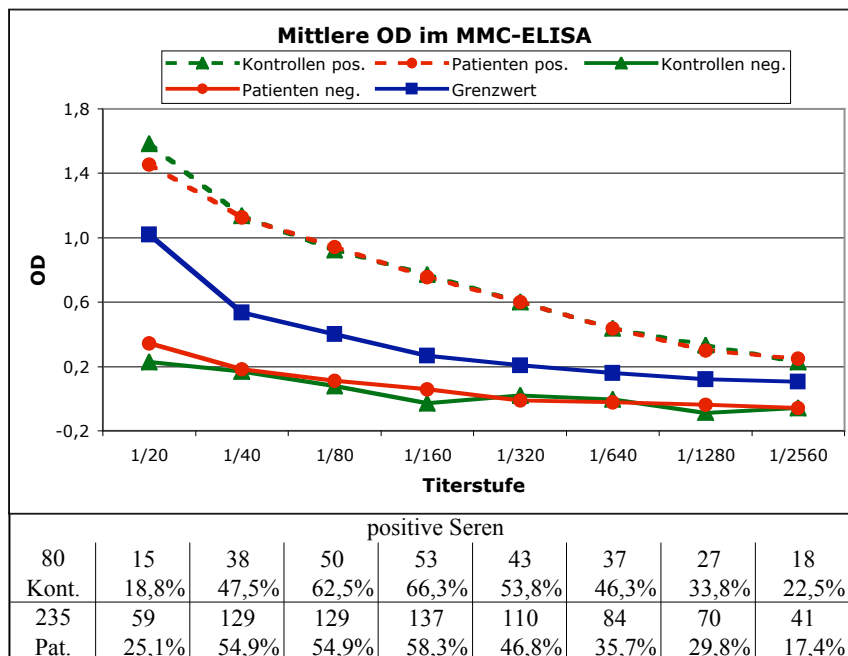


Abb.17: Einteilung der Rheuma- und Kontrollseren in MMC-Fragment (bp 381-878) Antikörper negative oder positive Seren sowie die Angabe der entsprechenden relativen Häufigkeiten für die einzelnen Titerstufen in Prozent. Insgesamt wurden 235 Rheuma- und 80 Kontrollseren getestet.

Für die weitere statistische Berechnung wurde ein Serum als positiv definiert, wenn die gemessene Optische Dicht in mindestens 2 Titerstufen höher als jene des Grenzwerts war. Damit lag die Anzahl der MMC-Fragment Antikörper-positiven Seren mit 65,0 % für die Kontrollen und 58,7 % für Rheumapatienten etwas über der Zahl der positiven Seren in den einzelnen Titerstufen. Die statistische Auswertung dieser Häufigkeiten bestätigte, dass sich die Rheumapatienten und beschwerdefreie Kontrollen in ihrer Antikörperverteilung gegen das, die potentiell kreuzreaktiven Epitope enthaltende MMC-Fragment nicht voneinander unterscheiden ($p = 0,39$).

3.2.1.5 Vimentin-Fragment-Antikörper

Die Kurven der mittleren Optischen Dichten für Antikörper gegen das Vimentin-Fragment unterscheiden sich optisch deutlicher als die für das MMC-Protein (siehe Abb.18).

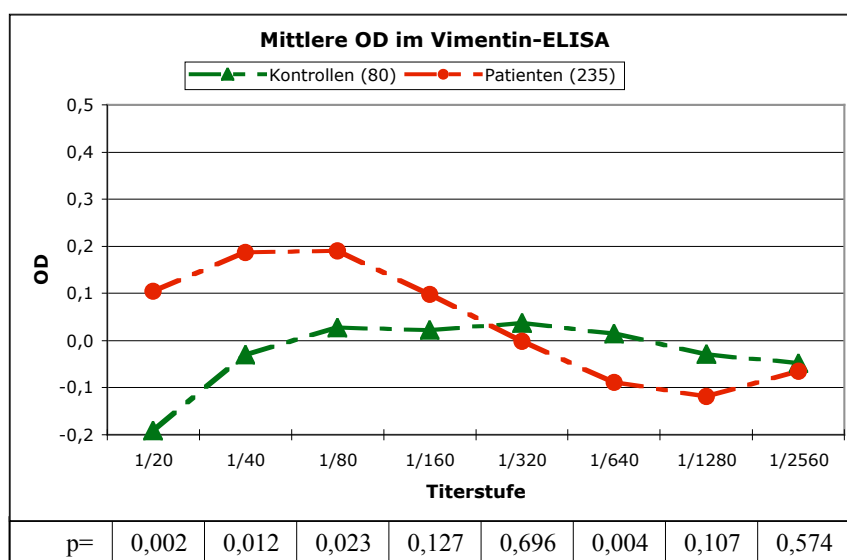


Abb.18: Kurvenverlauf der mittleren Optischen Dichten des Vimentin-ELISA. Zum besseren Vergleich mit Abb.16 wurde die dort angewandte Skalierung beibehalten.

Für die ersten 3 Titerstufen bis 1/80 und für die Stufe 1/640 ist der Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen signifikant.

Da in dieser Arbeit untersucht werden sollte, ob sich für Rheumapatienten und beschwerdefreien Kontrollen ein Verteilungsunterschied an Antikörpern gegen die potentiell kreuzreaktive Region des Vimentinproteins nachweisen lässt, ist eine eingehendere Betrachtung der Signifikanz dieser Messdaten nötig.

Teilt man die Seren, basierend auf die Ergebnisse des ebenfalls zur Rheumadiagnostik verwendeten CCP-ELISAs und nicht wie in Abb.18 geschehen, nach Rheumafaktor und Beschwerden, erhält man Gruppen mit 165 Rheuma- und 150 Kontrollseren, die sich in der

Antikörperverteilung gegen das Vimentinfragment in keiner Titerstufe signifikant voneinander unterscheiden (für alle Stufen $p > 0,09$).

Boxplotanalyse

Auch bei der Darstellung der Daten im Boxplot wird deutlich, dass sich die Gruppen in ihrer Antikörperverteilung kaum voneinander unterscheiden. Der Verteilungsbereich der OD ist in allen Titerstufen ähnlich, wobei die Streuungen im Falle der rheumapositiven Gruppen gewöhnlich größer sind (Abb.19).

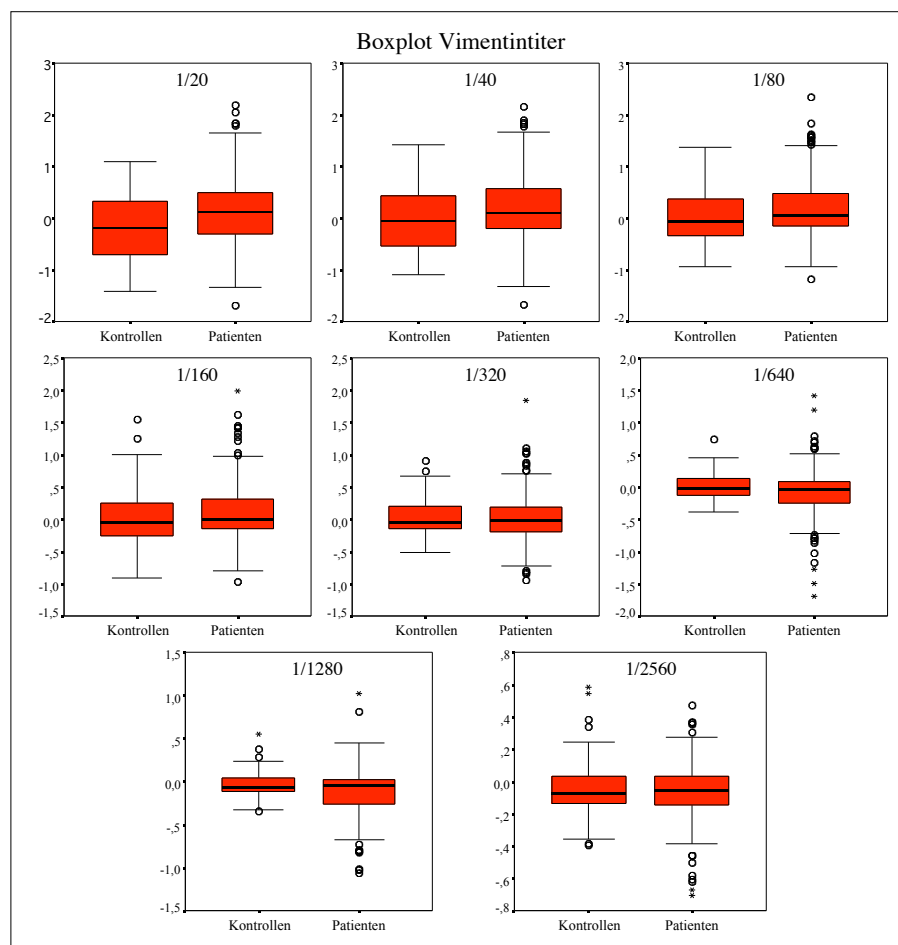


Abb.19: Boxplotgrafik für die Verteilung der gemessenen Optischen Dichten der einzelnen Titerstufen des Vimentin-ELISA. Trotz der berechneten signifikanten Unterschiede für die Titerstufen (1/20, 1/40, 1/80 und 1/320) liegen die Werte für Rheumapatienten und Kontrollen auch in diesen Stufen ähnlich verstreut. Es wurden 235 Rheuma- und 80 Kontrollseren getestet.

Die in Abb.18 und Abb.19 dargestellten Daten lassen keine Aussage über das Verhalten einzelner Seren zu, sie ermöglichen nur die Angabe einer Tendenz innerhalb der Gruppen. Weisen nur einige wenige Seren einer Gruppe einen sehr hohen Titer auf, könnten diese in einer so zusammenfassenden Darstellung untergehen. Um dieses Problem umgehen zu können, wurde eine Einteilung der Seren in Vimentin-Antikörper-positive, bzw. -negative vorgenommen. Als Grenzwert wurde der Mittelwert der OD des Standardserums festgelegt;

alle darüber liegenden Seren wurden somit als Vimentinfragment-Antikörper-positiv, alle darunter liegenden als -negativ definiert. Daraus ergaben sich die in Abbildung 20 dargestellten Kurven. Auffallend ist, dass kein Serum der Kontrollgruppe in der Titerstufe 1/20 positiv ist, dies spricht für einen vergleichsweise hohen Titer des als Grenzwert verwendeten Standardserums.

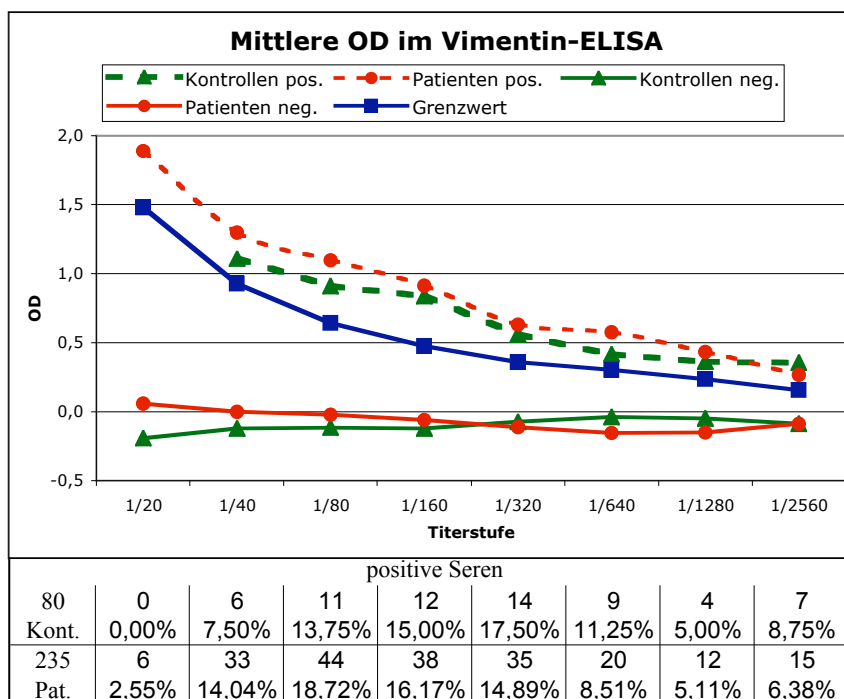


Abb.20: Einteilung der Rheuma- und Kontrollseren in Vimentin-Fragment (bp 381-878) Antikörper-negativ oder -positive Seren sowie die Angabe der entsprechenden relativen Häufigkeiten für die einzelnen Titerstufen. Insgesamt wurden 235 Rheuma- und 80 Kontrollseren getestet.

Auch hier wurde jedes Serum, welches in mindestens 2 Titerstufen den Grenzwert überschritt, als Vimentin-Fragment-Antikörper-positives Serum definiert. Nach dieser Einteilung reagierten insgesamt 15,0 % der Kontroll- und 18,7 % der Rheumaseren positiv im Vimentin-Fragment-ELISA. Statistisch besteht damit für die Verteilung der Antikörper gegen das Vimentin-Fragment in den beiden Gruppen kein Unterschied ($p = 0,121$).

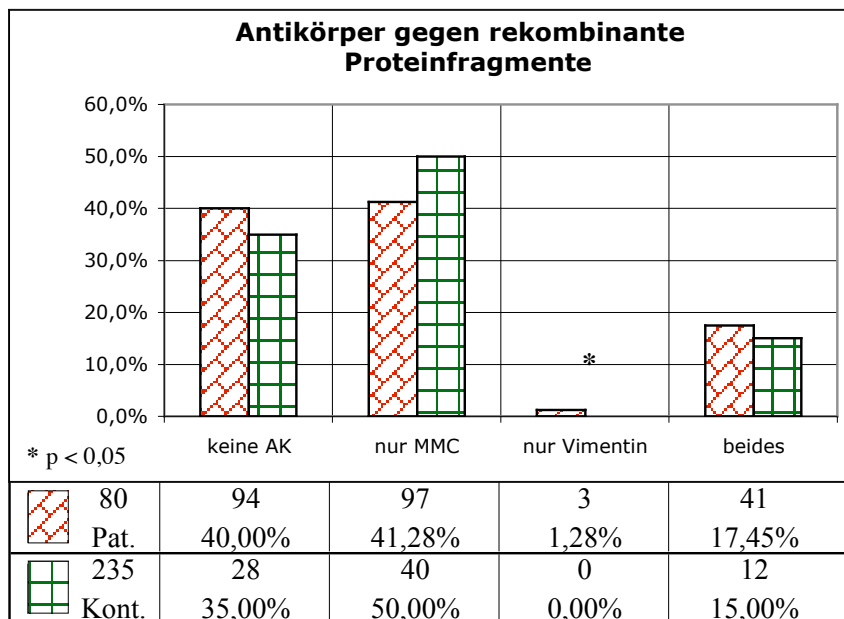
In beiden Gruppen traten die Antikörper gegen das getestete Vimentinfragment ebenso wie gegen das getestete MMC-Fragment mit den kreuzreaktiven Epitopen gleich häufig auf, statistische Unterschiede bestanden nicht.

3.2.1.6 Verteilung der Antikörper gegen das MMC- und das Vimentinfragment

Die zusammenfassende Analyse der Verteilung von Antikörpern gegen beide untersuchten Fragmente zeigte in Patienten- und Kontrollseren eine ähnliche Häufigkeitsverteilung (Abb.21 und Abb.22).

In 40,0 % der Rheumapatienten und 35,0 % der beschwerdefreien Kontrollen waren weder Antikörper gegen das eine noch das andere Proteinfragment positiv (die Optische Dichte lag nicht für mindestens je 2 Werte über dem Grenzwert). Der niedrigere Prozentsatz an Kontrollen ohne Antikörper war auf eine höhere Anzahl von Seren, die nur gegen das MMC-Fragment Antikörper bilden, zurückzuführen. Für die Rheumaseren betrug der Anteil von nur MMC-positiven Seren 40,0 %, für die Kontrollen lag der Anteil bei 50,0 %.

Abb.21: Verteilung von Antikörpern gegen das MMC- und das Vimentin-Fragment in Rheuma- und



Kontrollseren. In der Gesamtverteilung unterscheiden sich Rheumapatienten und Kontrollen signifikant voneinander ($p = 0,035$). Dieser Unterschied ist auf den signifikanten ($p = 0,016$) Unterschied in der Verteilung der „nur Vimentin positiven“ Seren zurückzuführen.

Seren, welche nur Antikörper gegen das Vimentin-Fragment, nicht aber mit dem MMC-Fragment aufwiesen konnten nur in 3 (1,28 %) der Rheumaseren, aber in keinem der Kontrollseren gefunden werden. Seren, in denen Antikörper sowohl gegen das MMC- und Vimentin-Fragment vorkamen, betrugen 15,0 % für die Kontrollen und 17,5 % für die Rheumapatienten.

Trotz der geringen Anzahl an nur positiven Vimentinseren ergibt sich für diese Verteilung ein signifikanter Unterschied ($p = 0,016$ nach Fisher-Yeats). Wie aber schon bei der Auswertung der Optischen Dichten verschwindet auch dieser Unterschied, verwendet man zur Einteilung der Seren in Rheuma-positive und -negative die Ergebnisse des CCP-ELISAs, da dann auch für eines der negativen Rheumaseren nur Vimentin-Fragmentantikörper nachweisbar waren.

Korrelation

55

Antikörper gegen die kreuzreaktiven Strukturen von Vimentin und MMC-Protein kommen also in ähnlicher Häufigkeit sowohl in Rheumapatienten als auch in beschwerdefreien Kontrollen vor. Nur in Rheumapatienten waren Seren zu finden, die zwar mit dem Vimentin-, nicht aber mit dem MMC-Fragment reagierten. Die so nachgewiesenen Antikörper reagierten genau wie die Antikörper in den nur MMC-Fragment positiven Seren wahrscheinlich mit Strukturen außerhalb der kreuzreaktiven Epitope. Da sich die Verteilung von Seren, die Antikörper gegen beide Fragmente aufweisen, in den Gruppen nicht unterschied, steht zu vermuten, dass die Bildung kreuzreaktiver Antikörper gegen Vimentin nach Infektion mit Gruppe G-Streptokokken keine Hauptursache für die Entstehung der Rheumatoiden Arthritis ist, auch wenn in Rheumaseren signifikant mehr Antikörper gegen das Vimentinprotein nachgewiesen werden konnten.

3.2.2 Nachweis von Antikörpern gegen bakterielles HSP60

Hitzeschockproteine spielen während einer Infektion eine wichtige Rolle. Sie werden nicht nur von dem Pathogen, sondern auch von dem Wirtsorganismus bei einer Infektion verstärkt gebildet. Auch in den Gelenken von RA-Patienten wurde eine verstärkte Expression humaner Hitzeschockproteine gemessen (Xue *et al.*, 1997). Die HSP sind eine Gruppe hoch konservierter Proteine und so wäre es denkbar, dass es im Laufe einer Infektion zur Bildung von Antikörpern kommt, die neben dem bakteriellen HSP auch Strukturen der humanen HSP erkennen. Diese Autoantikörper könnten eine der Ursachen für die bei Rheumapatienten beobachteten Gelenkschäden sein. Das Entstehen kreuzreaktiver Antikörper setzt die Bildung von Antikörpern gegen das bakterielle Protein voraus. Sollte die Bildung von Antikörpern und Autoantikörpern gegen HSP mitverantwortlich für die Entwicklung einer Rheumatoiden Arthritis sein, so wäre zu erwarten, dass die Verteilung der Antikörper gegen bakterielles HSP in den Seren von Rheumapatienten und gesunden Kontrollen verschieden ist. Für diese Untersuchung wurde das HSP60 (auch als GroEL1 bekannt) der Chlamydien verwendet. Der N- und der C-terminale Teil dieses Proteins wurden dabei getrennt untersucht, um eine eventuelle Lokalisation besonders antigener Bereiche in einem dieser Abschnitte zu ermöglichen.

3.2.2.1 Klonierung des HSP60

Als Ausgangsmaterial für die Klonierung diente ein *C. trachomatis* Stamm der Serovargruppe L₂. Die notwendigen Primer wurden anhand der von Cerrone *et al.* (1991) unter der Accessionnummer M58027 hinterlegten, 1635bp großen Nukleinsäuresequenz für *hsp60*

erstellt. Um neben einer allgemeinen Analyse der Antikörperhäufigkeit auch noch eine differenzierte Aussage über mögliche antigene Bereiche des HSP60 treffen zu können, wurde je ein rekombinantes Peptid aus dem C- bzw. dem N-terminalen Ende des Proteins konstruiert. Das rekombinante Protein des N-terminalen Teils wird nachfolgend als HSP-N, das den C-terminalen Teils repräsentierende als HSP-C bezeichnet. Entsprechend wurden die Primer als ChlHSP-N.fw, ChlHSP-N.rv bzw. ChlHSP-C.fw und ChlHSP-C.rv genannt (siehe Tab.5). Über die Expressionsvektoren pQE70 für HSP-N (Restriktionsorte SphI, BglII) und pQE60 für HSP-C (NcoI, BglII) wurde den rekombinanten Hitzeschockproteinen am C-terminalen Teil ein Histidinhexamer, welches zur Aufreinigung der Proteine diente, angefügt. Die Aufreinigung der Proteine erfolgte mittels Bindung an Nickelagarose. Beide Proteine konnten mit 8 M Harnstoffpuffer bei einem pH von 4,5 von der Säule gelöst und eluiert werden. Das erhaltene HSP-N Fragment besitzt in der Elektrophorese ein Molekulargewicht von ca. 32 kDa. Für das rekombinante HSP-C Fragment ergab sich in SDS-Gelen eine Größe von ca. 34 kDa (siehe Abb.21).

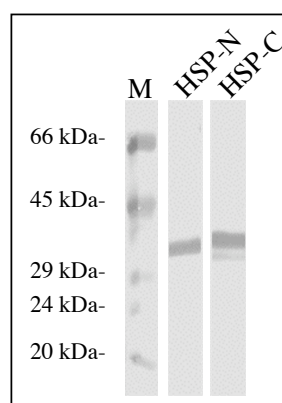


Abb.21: SDS-PAGE Ponceaurot von gereinigten rekombinanten Hitzeschockproteinen HSP-C (34 kDa) und HSP-N (32 kDa). Marker (M)

3.2.2.2 Untersuchung von Humansen auf Antikörper gegen bakterielles HSP

228 Seren wurden auf Antikörper gegen Chlamydien HSP untersucht. Bei 124 Seren handelte es sich um Seren von Patienten mit rheumatischen Erkrankungen und einem nachgewiesenen positiven Rheumatiter von über 256. Die Kontrollgruppe umfasste 104 Seren, welche sich aus 32 Sportlerseren, 61 Seren von Patienten einer Rehabilitationsklinik und 9 Seren von Klinikumspersonal, alle ohne rheumatische Beschwerden, zusammensetzte. Die Proteine wurden im beschriebenen Westernblotverfahren auf eine Nitrozellulosemembran gebracht, mit den Seren inkubiert und gebundene IgG-Antikörper anschließend mit einem Peroxidasegekoppelten monoklonalen Anti-IgG-Antikörper der Maus nachgewiesen.

Bei 62,1 % Proben der Patienten und bei 73,1 % der Kontrollgruppe konnten Antikörper gegen die rekombinanten Fragmente des HSP60 nachgewiesen werden. In 37,9 % der Rheumaseren und bei 26,9 % der Kontrollen wurden keinerlei Chlamydien-HSP-Antikörper gefunden. In beiden Gruppen wurde der C-terminale Proteinteil, HSP-C, häufiger als der N-terminale, HSP-N, erkannt (für Patienten: HSP-C 50,0 % und HSP-N 44,4 %, für Kontrollen: HSP-C 64,4 % und HSP-N 44,2 %).

Rund die Hälfte der Seren, in denen ein Antikörper gegen einen HSP-Teil gefunden wurde, reagierte auch auf den entsprechend anderen HSP-Teil (für Patienten 32,3 %, für Kontrollen 35,6 %) (Abb.22). Nur in der HSP-C Antikörper-Verteilung unterschieden sich Kontrollen und Patienten signifikant (Pearson Chi-Quadrat-Test $p = 0,038$). Diese Antikörper ließen sich in den Seren der Kontrollgruppe deutlich häufiger nachweisen.

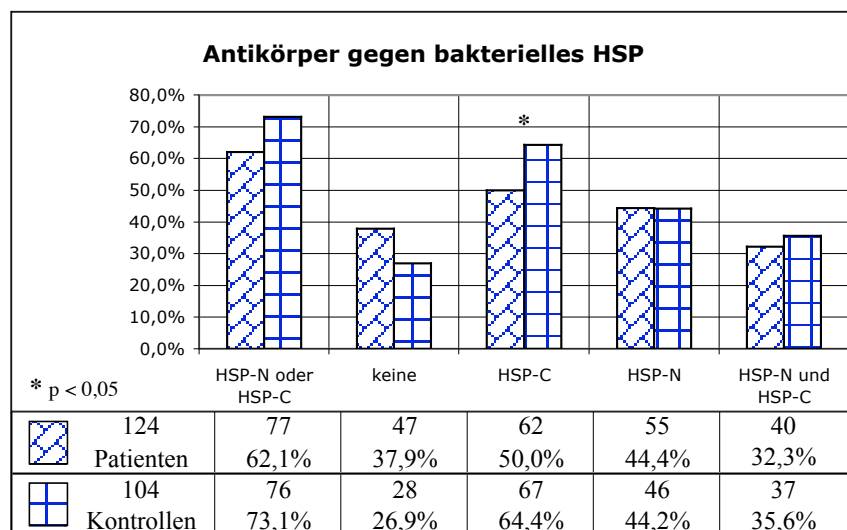


Abb.22: Antikörper gegen den rekombinanten N-terminalen (HSP-N) bzw. den C-terminalen (HSP-C) Teil des chlamydialen HSP60. Die Verteilungsunterschiede in der Gesamtverteilung sowie für HSP-N sind nicht signifikant ($p > 0,05$). Für HSP-C ist die Verteilungshäufigkeit mit $p = 0,038$ signifikant verschieden.

Eine weitere Beobachtung, welche zwar keine Aussagekraft über den Einfluss der ChlHSP-Antikörper auf die Entwicklung der Rheumatoiden Arthritis hat, aber nicht destoweniger interessant ist, wurde bei eingehender Betrachtung der Kontrollseren gemacht. Sportlerseren reagierten auffallend und mit statistischer Signifikanz häufiger mit chlamydialem HSP als die Seren der restlichen Kontrollgruppen (siehe Abb.23). Werden die Sportler aus dem Vergleich Rheuma-/Kontrollseren ausgeschlossen, sind sich diese beiden Gruppen noch ähnlicher als in Abbildung 22 dargestellt. Signifikante Unterschiede sind nicht mehr festzustellen.

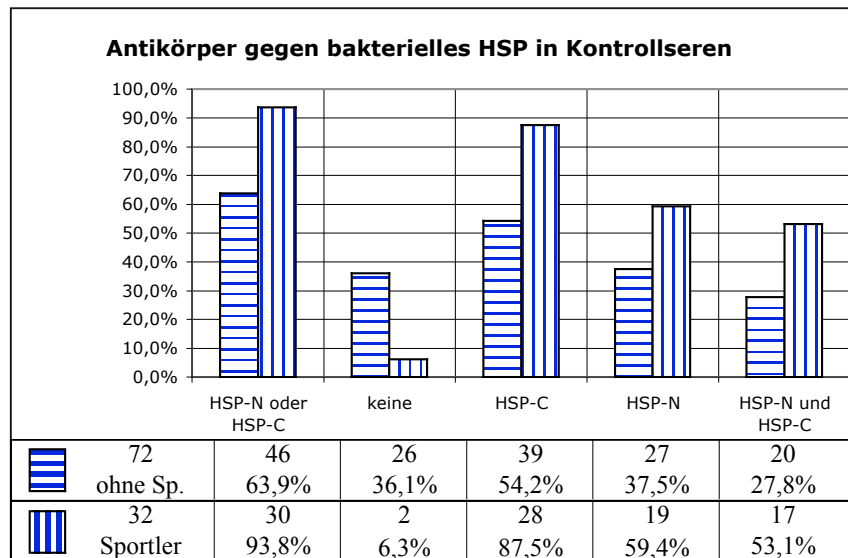


Abb.22: Antikörper gegen HSP-N und HSP-C in Kontrollseren ohne Rheuma. Für alle Gruppen unterscheidet sich die Verteilung der Antikörper signifikant ($p < 0,05$).

In dieser Testreihe wurden Antikörper gegen das chlamydiale HSP60 gesucht. Wegen der hohen Konserviertheit der Hitzeschockproteine kann jedoch davon ausgegangen werden, dass auch viele Antikörper, die aufgrund anderer Infektionen gebildet wurden, nachgewiesen wurden. Nach diesen ersten Untersuchungen scheint die Existenz von Antikörpern gegen bakterielles HSP60 in keinem Zusammenhang mit der Entwicklung einer Rheumatoiden Arthritis zu stehen. Ein Zusammenhang mit Infektionen durch bestimmte Bakterien und nachfolgende Antikörperbildung kann allerdings nicht ausgeschlossen werden. Da gerade die Chlamydien unter anderem wegen ihrer Neigung zur Persistenz mit arthritischen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden, lohnt sich die Untersuchung der Seren auf weitere, spezifischere Chlamydien-Antikörper. Dazu wurden die Seren mit einem zur Chlamydiendiagnostik verwendeten IgG-ELISA untersucht.

3.2.2.3 CT-IgG-ELISA

In Deutschland liegt die Durchseuchung der Bevölkerung mit akuter *C. trachomatis* Infektion, abhängig von der Altersgruppe, zwischen 1 und 8 Prozent (Petersen *et al.*, 1998). Sowohl bei Kontroll- als auch bei Rheumaseren lag der mit *C. trachomatis* HSP60 Antigenen reagierende Prozentsatz entschieden höher (siehe Abb.21), auch wenn man beachtet, dass der Anteil der Personen, mit IgG-Titer erwartungsgemäß größer ist, als der Anteil an Personen, bei denen sich mittels PCR oder IgA-ELISA eine frische Infektion nachweisen lässt. Nach frischen Infektionen wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht gesucht.

Die Seren wurden deshalb mit einem in der Chlamydiendiagnostik gebräuchlichen ELISA auf weitere, spezifische Chlamydienantikörper untersucht, um damit eine klare Aussage über eine zurückliegende Infektion mit *Chlamydia trachomatis* zu erlangen. Im verwendeten Test werden spezifische Hauptmembranproteine (Major outer membrane protein) als Antigene genutzt. Aufgrund von Serummangel konnten nicht alle im Westernblot auf HSP60 Antikörper untersuchten Seren im CT-IgG-ELISA gescreent werden. Getestet wurden 97 Rheuma- und 79 Kontrollseren.

Die Durchseuchung der Rheumapatienten entsprach mit 15,5 % annähernd den Kontrollen mit einer Durchseuchungsrate von 12,7 % (siehe Abb.24). Betrachtet man die einzelnen Kontrollgruppen, ergibt sich ein anderes Bild. Bei 34,8 % der Sportler, aber nur bei 3,6 % der Kontrollen aus der Rehabilitationsklinik (Seren von Klinikpersonal wurden nicht untersucht) wurden IgG-Antikörper gegen *C. trachomatis* gefunden. Dieser Unterschied in den Kontrollgruppen könnte unter anderem durch die Altersvarianz, aber auch abweichende soziale Kontakte und Aktivitäten erklärt werden.

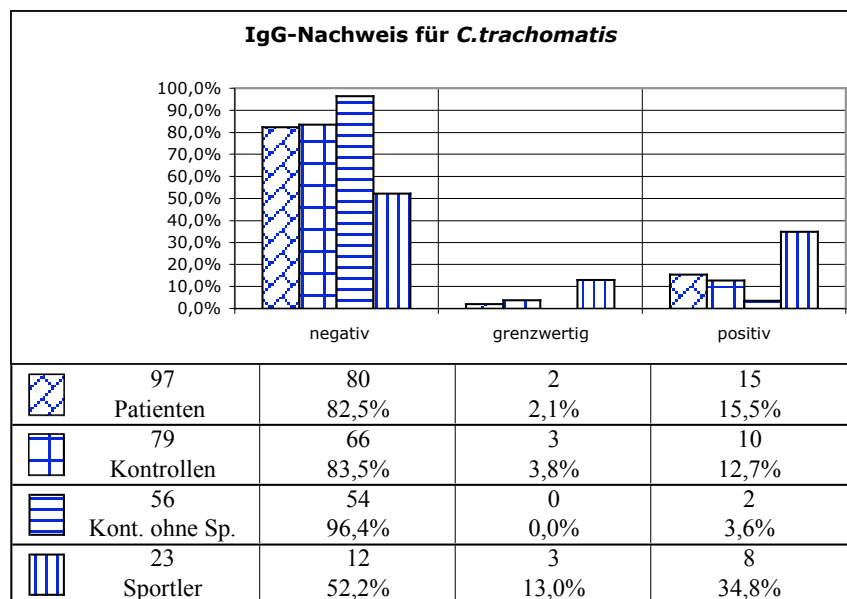


Abb.24: Im Serum durch IgG-Antikörper nachgewiesene *C. trachomatis* Infektionen in Rheuma- und Kontrollseren. Die Häufigkeit einer Infektion ist bei Rheumapatienten und rheumafreien Kontrollen beinahe identisch. Die Aufspaltung der Kontrollen in Sportler und Andere jedoch zeigt eine höhere Durchseuchung der Sportler mit *C. trachomatis*, im Vergleich zu allen anderen Gruppen. Die Kontrollgruppe der Nichtsportler weist entsprechend eine geringere Infektionshäufigkeit auf.

Da insgesamt nur wenige Seren im CT-ELISA positiv reagierten (15, bzw. 2 und 8), wurden bei der weiteren Betrachtung auf eine Splittung der Kontrollen in Sportler und Andere verzichtet. Grenzwertige Fälle wurden, wie auch die Fälle, in denen keine IgG-Bestimmung im ELISA durchgeführt wurde, bei den folgenden Berechnungen nicht mit einbezogen.

3.2.2.4 Verhältnis CT-IgG, HSP-N und HSP-C Antikörper

CT-IgG-ELISA-negative Seren

Für Seren, die im CT-IgG-ELISA negativ waren, ließen sich in der HSP-N und HSP-C Antikörperverteilung (Tab.14) keine signifikanten Unterschiede zwischen Rheumapatienten und Kontrollgruppe feststellen (in allen Fällen $p > 0,05$). Damit gleicht die Gruppe CT-IgG negativen Seren der in Abbildung 22 dargestellten Gesamtmenge aller auf HSP-Antikörper untersuchten Seren. Sie repräsentieren mit durchschnittlich 82 % (gegenüber 13 % CT-IgG positive Seren) auch die Mehrheit aller Seren.

Tab.14: Verteilung von HSP-N und HSP-C Antikörpern in CT-IgG negativen Seren

Antikörper gegen HSP in CT-negativen Seren					
	HSP-N oder HSP-C	keine	HSP-C	HSP-N	HSP-N und HSP-C
Patienten	62,5%	37,5%	52,5%	43,8%	33,8%
Kontrollen	71,2%	28,8%	62,1%	39,4%	30,3%

CT-IgG-ELISA-positive Seren

Anders als bei den Seren, die im Chlamydia trachomatis ELISA negativ waren, zeigte sich in den CT-IgG-positiven Seren die HSP-N und HSP-C Antikörperverteilung verschieden von den Häufigkeiten im Gesamtpool und den in den CT-IgG-negativen Seren. Außerdem, und hier wird es interessant, wick die Verteilung der HSP-Antikörper bei Patienten und Kontrollen stark voneinander ab (Abb.25).

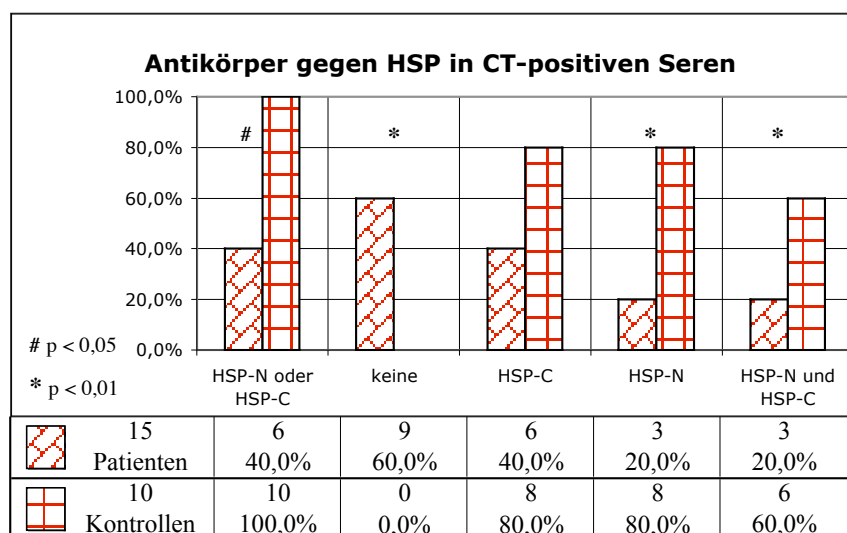


Abb.25: Die Verteilung von HSP-N und HSP-C Antikörpern in CT-IgG-positiven Seren weist große Unterschiede zwischen Kontrollen und Patienten auf. Nur 40 % der Rheumaseren, aber alle Kontrollen besitzen Antikörper gegen wenigstens einen Teil des chlamydialen HSP60. Die Unterschiede sind für „HSP-N oder HSP-C“ mit $p = 0,019$, für „keine“ mit $p = 0,003$, für „HSP-N“ mit $p = 0,005$ und für „HSP-N und HSP-C“ mit $0,009$ signifikant.

Der Unterschied, der sofort ins Auge fällt, betrifft die Gesamtverteilung der Antikörper. Alle CT-IgG-positiven Kontrollseren hatten Antikörper gegen HSP. In den CT-IgG-positiven Rheumaseren fanden wir nur in 40 % der Fälle Antikörper gegen eines der beiden HSP-Fragmente. In den Seren von Rheumapatienten sind Antikörper gegen HSP-N und gleichzeitig gegen HSP-C nur in 20 % nachzuweisen, bei den Kontrollseren beträgt der Anteil dagegen 60 %. HSP-C-Antikörper kamen bei Rheumapatienten doppelt so häufig vor wie HSP-N-Antikörper (HSP-C 40 %, HSP-N 20 %), bei Nichtrheumatikern ist dieses Verhältnis ausgeglichen (je 80 %). Auffallend war ebenfalls, dass alle Rheumapatienten, die Antikörper gegen HSP aufweisen, Antikörper gegen HSP-C gebildet hatten. Antikörper gegen HSP-N kamen nie allein vor, nur bei einigen Kontrollen ohne rheumatische Beschwerden war dies der Fall.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Fisher-Yeats-Test, der, anders als der in den vorangegangenen Berechnungen verwendete Chi-Quadrat-Test, auch bei wenigen Werten, in denen mehr als 20% der Zellen eine Häufigkeit von kleiner als 5 aufweisen, angewendet werden kann. Nur für HSP-C war der Unterschied zwischen Kontroll- und Rheumaseren nicht signifikant, was beachtenswert ist, da sich Rheumapatienten und Kontrollen gerade in der Häufigkeit der HSP-C Antikörper unterschieden, wenn man alle getesteten Seren ohne Einbezug des CT-ELISA betrachtete (siehe auch Abb.22). Für alle anderen Betrachtungen ergibt sich eine Signifikanz von $p < 0,05$ (siehe Abb.25).

Es ist davon auszugehen, dass hier zumindest die meisten Antikörper tatsächlich nach einer Infektion mit Chlamydien gebildet wurden und sie spezifisch für Chlamydien-HSP sind. Damit deutet sich ein Zusammenhang von Antikörperbildung gegen HSP60, insbesondere gegen den C-terminalen HSP-Teil, nach *Chlamydia trachomatis* Infektion und der Entwicklung Rheumatoider Arthritis an. Wobei vorhandene Antikörper aber eher eine protektive, als durch Kreuzreaktionen mit humanen HSP verursachte schädigende Wirkung zu haben scheinen.

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit dem Einfluss verschiedener bakterieller Antigene auf die Entwicklung und den Verlauf der Rheumatoiden Arthritis. Die RA ist eine sehr komplexe Erkrankung, bei deren Verlauf viele verschiedene Einflussfaktoren in Betracht gezogen werden müssen. Neben einer genetischen Veranlagung (Ronneld *et al.*, 1994; Gonzalez-Escribano *et al.*, 1999; Morgan *et al.*, 2000; Yamada *et al.*, 2001) und Umweltfaktoren (Krishnan, 2003) werden auch vorangegangene oder persistierende mikrobielle Infektionen als mögliche Auslöser einer RA diskutiert. Von denen an einer Arthritisbeteiligung von Pathogenen diskutierten Mechanismen (siehe Einleitung) wurden hier zum einen der Einfluss von Kreuzreaktionen und zum anderen die Folgen von Überstimulation des zellulären Immunsystems durch Superantigene untersucht. Dabei wurde Bezug auf spezielle Proteine zweier Pathogenfamilien, der Streptokokken und der Chlamydien, genommen.

Im ersten Teil der Arbeit wurden verschiedene Superantigene der Streptokokken auf ihre Fähigkeit zur Induktion eines Arthritisschubes in Mäusen untersucht.

Im zweiten Abschnitt wurde nach Antikörpern gegen kreuzreaktive Strukturen gesucht. Bei den untersuchten Proteinfragmenten handelt es sich um das chlamydiale HSP60, welches wie alle bakteriellen Hitzeschockproteine, auch große Homologien zum humanen HSP60 aufweist, und um das M-Protein von Gruppe G-Streptokokken, in dem sich Vimentin-ähnliche Epitope nachweisen lassen. Diese Untersuchungen wurden mittels Immunoblot und ELISA durchgeführt.

Die Ergebnisse dieser beiden Schwerpunkte der Arbeit werden im folgenden diskutiert.

4.1 Induktion von Arthritisschüben durch Superantigengabe in der Maus

Neben den Kreuzreaktionen zwischen Proteinen des Pathogens und des Wirts werden noch weitere Faktoren als mögliche Ursachen für die Rheumatoide Arthritis untersucht. Wir prüften einige Superantigene im Mausmodell, wegen Ihrer Fähigkeit eine Überstimulation des zellulären Immunsystems zu induzieren, was sie als mögliche Auslöser von Arthritisschüben in Betracht kommen läßt. In dieser Arbeit untersuchten wir verschiedene Superantigene von Streptokokken der Gruppe A und G auf Ihre Vermögen, in Mäusen nach dem Abklingen der akuten Phase einer Antigen-induzierter Arthritis einen erneuten Arthritisschub durch intravenöse oder intraartikuläre Gabe der Superantigene auszulösen. Das Hauptaugenmerk lag

bei diesen Untersuchungen also weniger auf der Entstehung einer Arthritis, sondern konzentrierte sich auf die im Verlauf einer Rheumatoiden Arthritis akuten auftretenden Schübe.

4.1.1 *In vitro* Stimulation von Mauslymphozyten durch Superantigene

Zu Beginn der Untersuchungen wurden die verschiedenen Superantigene im Lymphozyten-Transformationstest (LTT) geprüft, um zu testen, in welchen Konzentrationen die Mauslymphozyten auf die SAG ansprechen.

Im Lymphozyten-Transformationstest stimulierten die Superantigene die Mauslymphozyten sehr unterschiedlich zur Proliferation. Von den untersuchten Superantigenen benötigte SMEZ mit 0,32 µg/ml die niedrigste Konzentration zum Erreichen eines Stimulationspeaks. Es ist bekannt, dass Superantigene humaner Pathogene in murinen Zellen nur reduziert wirksam sind (Fleischer *et al.*, 1991). So genügten bei Untersuchungen an menschlichen Lymphozyten wesentlich geringere Konzentrationen von SMEZ oder SPE-A, um eine Proliferation zu induzieren. Jedoch war SMEZ (gegenüber SPE-A und SPE-C) auch im humanen System das stärkste Superantigen (Proft *et al.*, 2003). Müller-Alouf *et al.* (2001) stellten ebenfalls fest, dass SMEZ um das 18fache potenter ist als SPE-A. Im bereits erwähnten Experiment von Proft *et al.* (2003) wurde auch die Wirkung von Superantigenen auf die Lymphozyten 5 verschiedener Mäusestämme untersucht. Für SPE-C und SPE-G konnte dabei keinerlei Stimulierung der Proliferation gemessen werden. Der in unserer Arbeit verwendete Mäusestamm C57BL/6 wurde von Proft *et al.* (2003) allerdings nicht verwendet. Da diese Autoren ebenfalls zeigten, dass Superantigene auf verschiedene Mäusestämme einen unterschiedlich starken Effekt haben, ist nicht auszuschließen, dass SPE-G in C57BL/6 Mäusen aktivierend wirkt.

Auch für das MMC-Fragment der Gruppe G-Streptokokken konnte keinerlei Proliferationsstimulation festgestellt werden. Dieses Ergebnis stimmt mit früheren Untersuchungen bei GAS überein, bei denen weder das M5 (Schmidt *et al.*, 1995; Degnan *et al.*, 1997) noch das M6 Protein (Baker *et al.*, 2001) in der Lage waren, eine Proliferation der Lymphozyten auszulösen.

4.1.2 Mit geringen Konzentrationen verschiedener SAG und des MMC-Fragment ließ sich in Mäusen keine Arthritis reaktivieren

Für keines der getesteten Superantigene konnte durch die systemische Gabe von 2 µg oder die intraartikuläre Gabe von 0,44 µg ein durch Gelenkschwellung sichtbarer, signifikanter

Arthritisschub ausgelöst werden. Anders als bei Schwab *et al.* (1993), wo die Induktion eines Schubes in Ratten mit Streptokokken-Zellwand-induzierter Arthritis (SCWIA) durch SPE-A gelang, konnten wir auch mit SPE-A in diesen Konzentrationen keine signifikante Gelenkschwellung nachweisen. Diese Differenz ist wohl eher auf die unterschiedlichen Spezies (Maus bzw. Ratte) als die verwendeten Arthritismodelle (AIA bzw. SCWIA) zurückzuführen.

Die Injektion des als Kontrollprotein eingesetzten MMC-Fragments führte ebenfalls zu keinem Arthritisschub. Auch wenn Streptokokken M-Proteine anfänglich zu den Superantigenen gezählt wurden (Watanabe-Ohnishi *et al.*, 1994), steht heute eindeutig fest, dass sie keine superantigenen Eigenschaften besitzen (Schmidt *et al.*, 1995). Die Induktion eines Arthritisschubes nach dem postulierten Mechanismus der Kreuzreaktivität mit Vimentinstrukturen würde neben dem Vorhandensein dieser Strukturen im entsprechenden Knorpelprotein der Mäuse auch eine längere Expositionsdauer zur Bildung spezifischer kreuzreaktiver Antikörper voraussetzen. Eine Vorerkrankung im Sinne der AIA wäre für dieses Modell nicht von Nöten. Versuche mit diesem System wurden von uns aber nicht weiter verfolgt.

Die stärkste Gelenkschwellung wurde bei niedrigen Konzentrationen nach SPE-G-Gabe beobachtet. Dieses Superantigen verwendeten wir für weitere Untersuchungen, in denen auch höherer SAG-Konzentrationen eingesetzt wurden, welchen dann zu signifikante Ergebnisse führten.

4.1.3 Durch die intraartikuläre Gabe von SPE-G war die Induktion eines Arthritisschubes möglich

Durch die intraartikuläre Gabe von Superantigenen der Gruppe G-Streptokokken ließ sich in Mäusen ein transienter Arthritisschub auslösen. Die nach Injektion von SPE-G in das Knie ausgelöste Schwellung lag bei 20 µg/Maus mit 15 – 20 % deutlich über der Schwellung, die ohne vorhergehende Immunisierung mit mBSA in ähnlichen Konzentrationen erreichbar war. Diese Schwellung war unabhängig davon, ob eine mittels mBSA induzierte Arthritis am Tag 0 ausgelöst wurde oder nicht. Alle Mäuse, in denen eine Gelenkschwellung gemessen werden konnte, waren jedoch mit mBSA und *Mycobacterium tuberculosis* nach dem Schema für die AIA (siehe Methoden 2.7) immunisiert worden. Unbehandelte nicht immunisierte Mäuse wurden in dieser Studie nicht untersucht. Jedoch zeigen Untersuchungen von Cannon *et al.* (1988) dass das Auslösen einer Gelenkschwellung durch die intraartikuläre Gabe des *Mycoplasma arthritidis* Mitogen (MAM) in unbehandelten Ratten möglich ist. Eine Induktion

der Gelenkschwellung in Ratten mit AIA ließ sich in diesen Ratten allerdings nicht erreichen. Verschiedenen Gruppen gelang in anderen Arthritismodellen und mit unterschiedlichen Superantigenen ebenfalls die Aktivierung eines Arthritisschubes. Schwab *et al.* (1993) lösten in Ratten mit SCWIA durch die intraartikuläre Gabe des Toxischen-Schock-Syndrom-Toxins-1 von *Staphylococcus aureus* (TSST-1) eine Gelenkschwellung aus, die aber wie in unserem Fall schnell zurückging. Weitere Dosen des TSST-1 führten zu einem stetig verstärkten Anstieg der Schwellung. In Mäusen mit Kollagen-induzierter Arthritis kam es nach Gabe von TSST-1 zu einem früheren Beginn der Arthritis mit einem dramatischeren Verlauf (Kageyama *et al.*, 2001). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit schließen sich somit an die zitierten Untersuchungen an und zeigen die Möglichkeit einer Arthritisreaktivierung in einem weiteren Modell (AIA) mit einem Superantigen (SPE-G) eines weiteren Pathogens (Gruppe G- Streptokokken). Die Induktion eines Arthritisschubes mittels SPE-G wird hier erstmals beschrieben.

Die Untersuchungen der zitierten Arbeiten und die Diskussion unserer Ergebnisse konzentrierten sich bisher nur auf die durch Anschwellen des Kniegelenks sichtbaren arthritischen Zeichen. Daneben haben wir aber auch noch die Auswirkung der SPE-G-Gabe auf den histologischen Arthritisindex und die Milzgröße ausgewertet. So zeigte sich, dass die Gabe von SPE-G zu akuten Entzündungserscheinungen mit einem kurzfristigen Anstieg des histologischen Arthritisindex führte. Dies war auch dann der Fall, wenn keine deutliche Schwellung im Kniegelenk zu verzeichnen war. Im weiteren Verlauf führte die Gabe von SPE-G allerdings zu einer Reduktion des Arthritisindex. Dieser konzentrationsabhängige arthritisreduzierende Effekt von SPE-G war sowohl bei intraartikulärer als auch bei systemischer Gabe zu beobachten. Über die Betrachtung der Gelenkschwellungen an verschiedenen Tagen ließ sich der in der histologischen Auswertung beobachtete Arthritsrückgang nicht nachvollziehen. Die in der Versuchsreihe II gemessenen Milzgrößen implizieren allerdings ebenfalls eine durch das Superantigen SPE-G ausgelöste Reduktion der spezifischen Immunreaktion gegen mBSA.

Normalerweise kommt es während der im Rahmen der AIA durchgeführten Immunisierung und Auslösen der Arthritis zu einer bemerkbaren Zunahme der Milzgewichte, die im Laufe der nachfolgenden Tage wieder abnimmt. Hier betrug der Anteil der Milz am Gesamtkörpergewicht 35 Tage nach mBSA-Gabe rund 0,45 %. 10 Tage nach mBSA und 3 Tage nach intraartikulärer Gabe von SPE-G bestanden jedoch signifikante Unterschiede zwischen Kontrollen und Superantigengruppen. Milzen der Gruppen, die SPE-G intraartikulär erhalten hatten, waren bereits auf Werte (0,75 %) zurückgegangen, die weit unter jenen der

Kontrollgruppe (1,12 %) lagen. 21 Tage nach mBSA-Gabe war dieser Unterschied verschwunden und alle Gruppen wiesen ähnliche Milzanteile (0,60 %) auf.

Da keine Mäuse der i.v. Gruppen zu einem entsprechend zeitigen Zeitpunkt getötet wurden, kann über die Auswirkung der systemischen Gabe auf das Milzgewicht kurz nach mBSA-Induktion keine Aussage getroffen werden. Leichte Erhöhungen des Milzanteils in den SPE-G-Gruppen 16 Tage nach mBSA-Gabe deuten jedoch darauf hin, dass die systemische Superantigengabe zu einem Anschwellen der Milz führt. Dies ist nicht erstaunlich, hat doch eine intravenöse Applikation von Superantigenen Auswirkung auf den ganzen Organismus. Im Tier findet man unter anderem konzentrationsabhängig ein reduziertes Gewicht, Fieber und allgemeine Entzündungszeichen, welche auch die Milz beeinflussen (Cole *et al.*, 1993; Krakauer, 1999). Anders waren die Ergebnisse nach intraartikulärer Applikation. Waren Superantigene nach intraartikulären Injektion nur lokal im Kniegelenk vorhanden, blieb die Milz davon weitgehend unbeeinträchtigt. Dies ist mit einer zusätzlichen Entlastung der mit der chronischen arthritischen Entzündung kämpfenden Milz durch die T-Zell Erschöpfung nach Superantigengabe zu erklären. Die T-Zellen werden im Gelenk wirksam und der lymphatische Kreislauf der T-Zellen zur Milz wird unterbunden, so dass sich die Milz weder mit den Superantigenen noch mit den die Arthritis aufrechterhaltenden T-Zellen auseinandersetzen muss (Kawabe and Ochi, 1991). Eine Apoptose der zuvor stimulierten T-Zellen kann auch als Grund für die Verbesserung der Arthritissymptome nach dem ausgelösten Entzündungsschub angesehen werden. Die für die Aufrechterhaltung einer chronischen Arthritis nötigen T-Zellen wurden im Schub verbraucht oder erreichten ein anergisches Stadium, was zu einer Verbesserung des Krankheitsbildes führen kann.

Positive Auswirkungen von Superantigenen auf den Verlauf von Autoimmunerkrankungen wie Arthritis (Kumar *et al.*, 1997) und Experimenteller allergischer Enzephalomyelitis (Kalman *et al.*, 1993; Soos *et al.*, 1993) in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Superantigengabe wurden beschrieben. Kumar *et al.* (1997) gelang es mit SEB, nicht jedoch mit SEA, die Induktion einer Kollagen-induzierten Arthritis zu unterdrücken, wenn das Superantigen vor dem Kollagen appliziert wurde. Eine Injektion des Superantigens nach Auslösen der CIA führte, im Einklang mit den hier vorliegenden Ergebnissen, zu einer Verstärkung der Arthritisreaktion. Die von uns beobachteten positiven Einflüsse auf den weiteren Arthritisverlauf wurden von den Autoren nicht beschrieben. Die bisherigen Erfolge bei der Arthritisreduktion durch Superantigene wurden nur mit einem Superantigen, dem SEB von *Staphylococcus aureus*, erzielt.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte des Streptokokken-Superantigens SPE-G auf den Verlauf einer Arthritis in der Maus beschrieben. Neben einem akuten Schub konnte dabei als sekundärer Effekt eine arthritissreduzierende Wirkung nachgewiesen werden. Neu war ebenfalls die Kombination aus beobachtetem akuten, Superantigen-induzierten Arthritisschub und nachfolgendem Abklingen chronischer Arthritis Symptome.

Diese Ergebnisse bieten Ansatz für eine Reihe von weiteren Untersuchungen. Zum einen wäre es wichtig in Erfahrung zu bringen, wie zeitlich stabil die Verminderung der chronischen Arthritis durch Superantigengabe, auch nach wiederholter Gabe, ist. Ist ein solcher konstanter Effekt auch nach jeder weiteren SPE-G Injektion zu beobachten? Aber auch der Effekt des akuten Schubes sollte durch Austestung eines größeren Konzentrationsbereichs und unterschiedlichen zeitlicher Gabe abgesichert werden. Lässt sich durch wiederholte intraartikuläre Gabe des SPE-G ein erneuter Schub auslösen und nimmt die Sensibilität durch Wiederholungen eher zu oder ab? Weiterhin bleibt zu klären, in wie weit die durch SPE-G ausgelösten Schübe auch beim Menschen von klinischer Relevanz sind. Gibt es eine Korrelation von Arthritisschüben mit Infektionen?

4.2 Nachweis von Antikörpern gegen kreuzreaktive Strukturen

4.2.1 Kreuzreaktive Antikörper für Humanvimentin und das MMC-Protein von Gruppe G-Streptokokken

Unsere Arbeitshypothese war, dass bei der Entstehung Rheumatoider Arthritis immunologische Kreuzreaktionen zwischen bakteriellen Antigenen und körpereigenen Gewebestrukturen zur Schädigung dieser Gewebe führen können. Einen möglichen Angriffspunkt für derartige Interaktionen kann das Protein Vimentin sein, welches sich in hohen Konzentrationen im Knorpelgewebe befindet. Dieses Protein besitzt Epitope ähnlich dem multipel-bindenden M-Protein von Gruppe C-Streptokokken. Geyer *et al.* (1999) aus unserer Gruppe beschrieben neben der strukturellen Ähnlichkeit der coiled-coil Konstruktionen eine Sequenzhomologie in der Folge DIMRLREKLQ zwischen beiden Proteinen. Das M-Protein könnte somit bei einer Infektion mit Gruppe C-Streptokokken zur Bildung von Antikörpern führen, die auch mit Vimentin reagieren, dadurch Schäden im Gelenkknorpel verursachen und Rheuma induzieren oder einen Krankheitsschub verursachen. Falls die Induktion von Vimentinautoantikörpern bei der Entstehung der Rheumatoiden Arthritis tatsächlich von Bedeutung ist, sollten sich in Patienten mit dieser Erkrankung erhöhte Antikörpertiter gegen Vimentin messen lassen. Der Nachweis eines zusätzlichen Markers für die RA könnte neben seiner diagnostischen und möglichen therapeutischen Bedeutung auch die Vorhersagbarkeit des Verlaufs der Erkrankung erhöhen, ein Ziel, welchem die Kliniker besonderes Interesse beimessen (Kim und Weisman, 2000). Der Schwerpunkt lag jedoch bei dieser Arbeit auf der Bedeutung kreuzreaktiver Vimentin-MMC-Antikörper für die Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis.

4.2.1.1 Ein Nachweis von Antikörpern gegen biotinylierte homologe Epitope von Vimentin und MMC im ELISA war nicht möglich

Der direkte Nachweis von Antikörpern gegen als kreuzreaktive Epitope in Frage kommende, coiled-coil Motive im Vimentin und im MMC-Protein musste aufgegeben werden, da im dafür entwickelten Streptavidin-ELISA unspezifische Antikörperreaktionen dominierten.

Das Biotinylieren ist eine Standardmethode, die bei der Isolierung und Charakterisierung von Biomolekülen verwendet wird (Bayer und Wilchek, 1990). Man geht davon aus, dass Biotin mit seinem sehr kleinen Molekulargewicht keinen Einfluss auf die Interaktionen anderer Biomoleküle hat. Es gibt allerdings auch Untersuchungen, die zeigen, dass das Biotinylieren von Peptiden sehr wohl eine Konformationsänderung im Peptid auslösen kann, die zu einem veränderten Antikörperbindeverhalten führt (Grunnigen und Schneider, 1989). Auch Peter *et*

al. (2003) haben sich mit diesem Problem beschäftigt und den Einfluss der Biotinylierung auf das Antikörperverhalten von Peptiden untersucht. Sie stellten ebenfalls fest, dass es durch Biotin zu einer für die Antikörper hinderlichen Konformationsänderung kommen kann, die sich allerdings nur bei gelösten Peptiden auswirkt. Sind die Peptide, wie auch im hier entwickelten ELISA, an Streptavidin gebunden, werden sie besser als entsprechende unbiotinylierte Peptide von ihren Antikörpern erkannt. Trotzdem kann eine Konformationsänderung als Grund für die beobachteten fehlenden spezifischen Antikörperbindungen nicht ausgeschlossen werden.

Neben einer Biotin-induzierten Konformationsänderung, die eine spezifische Antikörperbindung verhindert haben könnte, muss auch die nachgewiesene Reaktion von Humanseren mit Streptavidin als mögliche Ursache für die Ineffektivität dieses Peptid-ELISA diskutiert werden. Eine Reaktion von Humanseren mit Streptavidin ist in der Literatur bisher jedoch nicht beschrieben worden. Es wäre möglich, dass die beobachteten unspezifischen Antikörperbindungen durch nicht ausreichende Waschschrte verursacht worden sind. Dagegen spricht, dass auch im Westernblot, wo durch deutlich längere Waschschrte ein solcher Fehler ausgeschlossen werden kann, eine Reaktion zwischen Streptavidin und Humanseren nachweisbar war.

Die hier besprochenen Tests wurden wie in Material und Methoden beschrieben gründlich gewaschen. Jedoch erfolgte diese Waschung nicht automatisiert, sondern von Hand. Wie bei der Analyse des ebenfalls durchgeführten CT-IgG ELISA gesehen, kann ein automatisierter Waschschrte für das Funktionieren eines Testes von Bedeutung sein. Bei genanntem CT-IgG ELISA kam es nach manuell durchgeführten Waschungen zu einer hohen Anzahl falsch positiver Ergebnisse. Da uns die enorme Wichtigkeit einer automatisierten Waschung zum Zeitpunkt der Untersuchung am MMC- / Vimentin-Fragment ELISA noch nicht bewusst war und auch keine technische Möglichkeit dafür bestand, erfolgten die Waschschrte per Hand. Ein Einfluss auf die Ergebnisse der ELISAs kann deshalb nicht ausgeschlossen werden. Man kann jedoch davon ausgehen, dass der Einfluss weniger dramatisch ist als in kommerziellen ELISAs. Zum einem wird bei diesen oft (so auch im Falle des CT-IgG ELISA) nur zwischen positiv oder negativ unterschieden, während im hier angewandten Test eine Tendenz der Antikörperverteilung untersucht wurde, zum anderen werden diese Tests von verschiedenen Personen unter vielen verschiedenen Arbeitsbedingungen angewandt. Die hier durchgeführten Untersuchungen wurden stets von der gleichen Person vorgenommen, so dass die Platten untereinander durchaus vergleichbar blieben. Für die diagnostische Anwendung des ELISAs ist eine Automatisierung der Waschschrte auf jeden Fall von höchster Priorität.

4.2.1.2 Antikörper gegen die Proteinfragmente MMC (bp 185-619) und Vimentin (bp 381-878) sind in Rheuma- und Kontrollseren mit annähernd gleicher Häufigkeit nachweisbar und eignen sich nicht zur Rheumadiagnostik

Da der Nachweis von Antikörpern gegen die homologen Epitope der beiden Proteine MMC und Vimentin nicht gelang, wurden größere Proteinfragmente hergestellt und im ELISA zur Suche nach Antikörpern verwendet.

Die sich aus diesen Untersuchungen ergebenden durchschnittlichen Werte der gemessenen Optischen Dichte lagen für das MMC-Fragment weit über denen des Vimentin-Fragments. Für Vimentin ergab sich ein sehr untypischer Kurvenverlauf, was auf die meist niedrigen Werte der durchschnittlichen OD zurückzuführen ist. Der Kurvenverlauf mit höherer OD für das MMC-Fragment ist nicht überraschend, geht man davon aus, dass Antikörper gegen die pathogenen Gruppe C-Streptokokken die Regel, Antikörper gegen körpereigenes Vimentin jedoch die Ausnahme sind. Dies trifft insbesondere zu, da das M-Protein-Fragment besonders im C-terminalen Bereich Homologien zu den M-Proteinen der GAS und GGS aufweist, also einige der detektierten Antikörper wahrscheinlich auf Infektionen mit diese Pathogenen zurückzuführen sind. Sowohl für MMC als auch für Vimentin verlaufen die Kurven beider Gruppen relativ kongruent (Abb.16 und Abb.18). Der in einigen Titerstufen gemessene signifikante Unterschied zwischen den beiden Gruppen verschwand, wenn statt des Rheumafaktors und den Krankheitssymptomen der CCP-ELISA als Einteilungsgrundlage verwendet wurde. Dies bedeutet, dass sich für einzelnen Werte der OD keine relevanten, reproduzierbaren Unterschiede zwischen Rheumapatienten und der Kontrollgruppe feststellen lassen. Auch eine Unterteilung der Seren in MMC- und Vimentin-Fragment-positiv bzw. -negative mittels eines durch das Standardserum festgelegten Grenzwerts ließ keinen Unterschied zwischen den Gruppen erkennen.

Neben den Werten der Optischen Dichten wurde auch die Häufigkeit betrachtet, mit der Seren der beiden Gruppen auf das eine, das andere oder beide Fragmente positiv reagierten. Als positives Serum wurde dabei ein Serum definiert, dessen OD in mindestens 2 Werten über dem Grenzwert lag. Wie schon der Verlauf der Kurven der Optischen Dichten erkennen ließ, waren sowohl bei Rheumatikern als auch bei Kontrollen der Anteil an MMC-Fragment-Antikörper-positiven Seren höher als an Vimentin-Fragment-Antikörper-positiven. Bei dem Anteil an MMC-Fragment-Antikörper-positiven Seren überwogen mit 65 % die Kontrollen (Rheumaseren 59 %). Mit der Antikörperverteilung gegen das Vimentinfragment verhält es sich umgekehrt und es waren mit 19 % etwas mehr Rheumaseren als Kontrollseren (15 %) Vimentin-Fragment-Antikörper-positiv. Da dieser Unterschied nicht signifikant war, eignet

sich ein Nachweis von Antikörpern gegen das Vimentinfragment (bp 381-878) nicht zur Diagnose einer Rheumatoiden Arthritis.

Erfolgversprechender scheinen dafür neue Ergebnisse verschiedener Gruppen zum Nachweis von Serumantikörpern gegen citrulliniertes Vimentin zu sein. Als Antigen für SA-Antikörper (Antikörper einer Patientin mit dem Namen Sa...), die eine Spezifität von über 95 % (Hueber *et al.* 1999) für die RA besitzen, wurde citrulliniertes Vimentin identifiziert (Vossenaar *et al.*, 2004). Citrulliniertes Vimentin entsteht während der Apoptose durch Umwandlung der Aminosäure Arginin in Citrullin (Asaga *et al.*, 1998). Da citrulliniertes Vimentin erst im Prozess einer Entzündung entsteht, sind diese Antikörper wahrscheinlich jedoch eher ein Produkt der Reaktionen auf RA als Auslöser dieser Erkrankung (El-Gabalawy and Wilkins, 2004). Da es sich bei citrulliniertem Vimentin also um ein Abbauprodukt handelt, ist nicht davon auszugehen, dass Antikörper gegen dieses Protein Schäden am gesunden Gewebe verursachen. Untersuchungen zum Nachweis von SA- und anderen citrullinierten Vimentinantikörpern verfolgen also, anders als das hier der Fall war, ein rein diagnostisches Ziel, ohne auf Ätiologie der RA einzugehen, die mit der vorliegenden Arbeit in erster Linie betrachtet werden sollte. Die bisher als Antigen für Antikörper gegen citrulliniertes Vimentin identifizierten Proteinabschnitte liegen in anderen Bereichen, als das von uns untersuchte Vimentinfragment (El-Gabalawy and Wilkins, 2004; Hill *et al.*, 2003). Da jedoch auch unsere untersuchte coiled-coil Region DIMRLREKLQ und das umgebende Fragment (bp 381-878) Arginin enthält, ist nicht auszuschließen, dass auch dieser Proteinabschnitt nach Citrullinierung mit den entsprechenden Antikörpern detektierbar wäre. Es kann jedoch ausgeschlossen werden, dass es sich in der vorliegenden Arbeit bei den nachgewiesenen Antikörpern um Antikörper gegen citrulliniertes Vimentin handelt, da das zum Nachweis verwendete rekombinante Proteinfragment in *E. coli* exprimiert wurde und dort keiner Citrullinierung unterlief.

Für eine Aussage über die Bedeutung von Kreuzreaktionen zwischen den homologen Epitopen von Vimentin und MMC-Protein bei der Entstehung der Rheumatoiden Arthritis ist eine vergleichende Auswertung beider ELISAs notwendig. Bei einer entsprechenden Analyse fällt auf, dass nur Seren der Rheumapatienten mit Vimentin reagierten, ohne auch mit MMC zu reagieren (1,28 %). Dieser Unterschied ist statistisch signifikant, werden die Seren nach Rheumafaktor und –beschwerden eingeteilt. Bei einer Einteilung nach Ergebnissen des CCP-ELISAs (Nachweis von Antikörpern gegen zyklisch citrulliniertes Peptid) war auch eines der Kontrollseren positiv und kein signifikanter Unterschied mehr messbar. Für diese 3 Seren kann jedoch sicher angenommen werden, dass sie nicht mit dem DIMRLREKLQ – Motiv im

Vimentin reagierten, sondern die Antivimentin-Antikörper andere Strukturen in diesem Protein erkennen. Entsprechend gilt auch, dass in Seren, die nur mit dem MMC-Fragment reagierten (Kontrollen 50,00 %, Patienten 41,28 %), andere Epitope erkannt wurden. Demzufolge ist der allergrößte Teil der Antikörper in den Seren, in denen Antikörper gegen beide Proteinfragmente nachweisbar waren (Kontrollen 15,00 %, Patienten 17,45 %), spezifisch für die untersuchten homologen Epitope. Die Wahrscheinlichkeit von einem kombinierten Auftreten von Antikörpern gegen nicht-homologe Epitope ist verschwindend gering und liegt unter einem Prozent. Auch die Korrelationsanalyse zeigt, dass zwischen dem Auftreten von MMC- und Vimentin-Fragment-Antikörpern ein hochsignifikanter Unterschied besteht. Zwischen den beiden Proteinfragmenten besteht mit einem Korrelationsfaktor von 0,478 eine mittlere Korrelation. Gleichzeitig kann durch das häufige Auftreten von Vimentinantikörpern in beschwerdefreien Kontrollen, entgegen unserer Theorie, aber auch ausgeschlossen werden, dass Autoantikörper gegen Vimentin, die durch Kreuzreaktionen mit homologen Epitopen auf dem M-Protein von Gruppe C-Streptokokken entstehen, einen entscheidenden Anteil an der Entwicklung Rheumatoider Arthritis haben. Dass dies in einzelnen Fällen aber trotzdem eine Ursache für den Ausbruch einer RA sein kann, ist damit allerdings nicht ausgeschlossen. Die leichte Tendenz der Rheumaseren, etwas häufiger mit Vimentin zu reagieren als die Kontrollseren, spricht dafür, dass zumindest bei einigen der Rheumafälle Antikörper gegen das untersuchte Epitop, aber auch gegen andere Strukturen des Vimentins an der Ätiologie der Rheumatoiden Arthritis beteiligt sein können.

In unserer Studie waren Vimentinantikörper in den Seren von Rheumapatienten nicht signifikant häufiger als in Kontrollen nachweisbar. Dies ist ein Ergebnis, dass durch die Literatur nicht immer bestätigt wird. Osung *et al.* beschrieben 1982 ein deutlich höheres Vorkommen von Vimentinantikörpern in Rheumaseren. Mayet *et al.* wiesen 1990 ein vermehrtes Auftreten von Vimentinantikörpern in der Synovialflüssigkeit von Rheumapatienten nach. In den Versuchen von Alcover *et al.* (1985) und Vossenaar *et al.* (2004) konnten diese Ergebnisse nicht bestätigt werden. In den Versuchen dieser Gruppen lag der Anteil an Rheumatikern mit Vimentinantikörper nicht höher als der in gesunden Kontrollen. Im Gegensatz zu unserer Untersuchung wurden in all diesen Fällen Antikörper gegen das ganze Vimentinprotein gesucht. Wir analysierten nur einen kleinen Abschnitt des Vimentinproteins. Sollten sich Antikörper gegen Vimentin in Rheumaseren tatsächlich deutlich häufiger als in Kontrollen finden lassen, ist anzunehmen, dass sich die entsprechenden Epitope außerhalb der von uns untersuchten Vimentinregion befinden.

Da also kreuzreaktive Antikörper zwischen MMC und Vimentin höchstens selten für eine RA verantwortlich sind, kann man annehmen, dass der Körper in den meisten Fällen in der Lage ist, die Autoantikörper so zu regulieren, dass sie keinen Schaden anrichten können. Es wäre denkbar, dass hier eine Folgeinfektion mit Superantigen-produzierenden Pathogenen zu einer Deregulation führt und eine RA verursacht. Diese These bleibt zu überprüfen.

4.2.2 Antikörper gegen chlamydiales Hitzeschockprotein 60 in Seren von Rheumapatienten und Kontrollen

Eine weitere Hypothese, welche in dieser Arbeit überprüft wurde, ging davon aus, dass das Entstehen von Antikörpern gegen Chlamydien-HSP während einer *Chlamydia trachomatis* Infektion, durch Induktion von kreuzreaktiven Antikörpern zum humanen HSP eine weitere Ursachen für die Entwicklung Rheumatoider Arthritis sein kann und dass sich dieser Zusammenhang durch ein vermehrtes Vorkommen von chlamydialen HSP60-Antikörpern nachweisen ließe. Eine erhöhte Bildung von Antikörpern steigert die Wahrscheinlichkeit der Entstehung von kreuzreaktiven Antikörpern.

Für diese Analyse wurden über 200 Seren von Rheumapatienten und 100 Seren von Kontrollen ohne rheumatische Beschwerden auf chlamydiale HSP60-Antikörper getestet, wobei, für eine weitere Aufgabe, Antikörper gegen den C- und N-terminalen HSP-Teil unterschieden wurden. Neben der oben genannten Hypothese galt es zu überprüfen, ob eines der beiden Antikörperfragmente die Bildung von Antikörpern stärker stimuliert als das andere. Da es durch die hohe Homologie der Hitzeschockproteine auch zu Kreuzimmunitäten zwischen verschiedenen Bakterien kommen kann, wurden die Seren auch auf einen weiteren Antikörper gegen Chlamydien getestet.

4.2.2.1 Antikörper gegen bakterielles Hitzeschockprotein 60 (auch GroEL) kommen in Rheumapatienten und Kontrollen mit gleicher Häufigkeit vor

Die Analyse der Seren im Westernblot ergaben keinen signifikanten Unterschied zwischen Patientengruppe und Kontrollen im Vorkommen von *C. trachomatis* HSP60-Antikörpern. In beiden Gruppen konnten viele Seren mit Antikörpern gegen zumindest einen HSP60-Teil detektiert werden.

Dieses Ergebnis lässt sich durch den Einfluss verschiedener Faktoren erklären. Wie in der Einleitung beschrieben, können viele Faktoren wie auch Pathogene bei der Entstehung der Rheumatoiden Arthritis eine Rolle spielen. Es ist daher zu erwarten, dass nur ein Teil der untersuchten Rheumafälle auf eine Infektion mit *Chlamydia trachomatis* zurückzuführen sind.

Zum anderen wurde ein insgesamt sehr hoher Prozentsatz an HSP60-Antikörpern gemessen, der weit über der chlamydialen Durchseuchungsrate liegt. Da die Hitzeschockproteine hoch konserviert sind, ist es denkbar, dass ein großer Teil der nachgewiesenen Antikörper durch Infektionen mit anderen Mikroorganismen induziert wurde und nicht auf einen direkten Kontakt mit *Chlamydia trachomatis* zurückzuführen ist.

Unter diesem Gesichtspunkt verwundert auch die leichte Erhöhung der Antikörper bei Sportlern nicht weiter. Sportler sind im Vergleich zur weniger sportlichen Normalbevölkerung aufgrund ihres Hobbies/Berufs durch Aufenthalte in öffentlichen Umkleekabinen, Waschräumen und Saunen einer erhöhten Belastung durch Keime verschiedenster Art ausgesetzt. Auch das trainierte Immunsystem der Sportler kann für den höheren Prozentsatz von Antikörpern in dieser Gruppe verantwortlich sein (Nieman *et al.*, 1998; Petibois *et al.*, 2003).

Durch die gleichmäßige Verteilung der HSP-Antikörper in beiden Gruppen ergibt sich die Schlussfolgerung, dass sich durch den Nachweis von Antikörpern gegen ein bakterielles Hitzeschockprotein allein keine Aussage über die Rheumaaanfälligkeit oder die Bedeutung dieses Hitzeschockproteins machen lässt.

Um zu untersuchen, welche Rolle die Infektion mit Chlamydien und die Bildung von Antikörpern gegen das HSP60, speziell dieses Bakteriums bei der RA spielt, war es nötig, vor einer Beurteilung der Verteilung der HSP60-Antikörper ihr Vorhandensein mit einer vorangegangenen *C. trachomatis* Infektion abzugleichen. Dazu wurden alle Seren mit einem kommerziellen Kit für *C. trachomatis* untersucht.

4.2.2.2 MOMP-IgG konnte mit dem CT-IgG ELISA in Seren von Rheumatikern häufiger nachgewiesen werden als in Kontrollen

Vor einer Auswertung der Chlamydieninfektion-assoziierten Antikörper gegen chlamydiales HSP60 lohnt sich die Auswertung der Ergebnisse des CT-IgG ELISAs, da bereits hier erste Unterschiede zwischen den Gruppen festzustellen waren. Beide Gruppen wiesen einen unterschiedlichen Prozentsatz an IgG Antikörper gegen das Hauptmembranprotein (MOMP) auf. Dieser Unterschied war aber nicht signifikant. Der Anteil der positiven Rheumapatientenserum lag mit 16 % nur etwas höher als der von den Kontrollseren (13 %). Auch bei dieser Untersuchung lohnt sich ein Blick auf die einzelnen Gruppen der Kontrollseren, da hier zwischen Sportlern und Rehabilitationspatienten signifikante Unterschiede deutlich werden. Nur 3,6 % der Rehabilitationspatienten gegenüber 34,8 % der Sportler waren IgG-positiv. Verschiedene Ursachen für dieses Ergebnis müssen diskutiert werden.

Wie bereits oben erwähnt, spielen unterschiedliche Verhaltensmuster hier sicher eine Rolle. Ein anderer Faktor ist aber wohl entscheidender. Obwohl über die Alterszusammensetzung der Rheumapatienten und Kontrollen nichts bekannt ist, kann davon ausgegangen werden, dass sowohl Rheumatiker als auch die Patienten der Rehabilitationsklinik einen höheren Altersdurchschnitt als die Sportler aufweisen. Ein höheres Alter sollte aufgrund von weniger häufig wechselnden Sexualpartnern mit einer geringeren Infektionsgefahr für sexuell übertragbare Krankheiten wie *C. trachomatis* verbunden sein. Entsprechend liegen die höchsten Durchseuchungsraten (Nachweis einer akuten Infektion mittels PCR oder Nachweis von IgA) bei diesem Keim für Frauen im Alter von 15 bis 19 Jahren (7 %) und für Männer zwischen 20 und 24 Jahren (10%), danach nimmt die Durchseuchung stetig ab (Petersen *et al.*, 1998).

Das Alter ist auch in einer anderen Hinsicht von Bedeutung; IgG-Antikörper stehen dem Körper zwar noch lange nach einer Infektion zur Verfügung, aber auch sie werden früher oder später abgebaut. Findet man also bei einer jüngeren Gruppe mehr IgG-Antikörper als bei einer älteren, so kann das zum Beispiel wegen eines veränderten Sexualverhaltens im Laufe der Generationen für eine erhöhte Infektionsrate der jüngeren Generation sprechen. Es kann ebenso gut Zeichen von gerade überstandenen gegenüber einer bereits lange zurückliegenden Infektionen sein.

Betrachtet man nun die Kontrollseren ohne Sportler und vergleicht sie mit den Rheumaseren, so ist der Verteilungsunterschied für MOMP-IgG signifikant ($p = 0,019$). Dies spricht zumindest für einen bestimmten Patientenkreis für eine Korrelation zwischen Anti-Chlamydien-IgG und dem Auftreten einer Rheumatoider Arthritis, bei einem. Dabei ist wahrscheinlich weniger die Erstinfektion als eine mögliche langjährige Persistenz dieses Keimes für den Krankheitsverlauf entscheidend.

4.2.2.3 Antikörper gegen chlamydiales HSP 60 in *C. trachomatis* MOMP-IgG positiven Seren sind bei Rheumapatienten nicht immer vorhanden

Bezieht man die vorangegangenen Ergebnisse des MOMP-IgG ELISAs in die Auswertung der HSP60-Antikörperverteilung ein, ergibt sich folgendes Bild. In ausnahmslos allen MOMP-IgG-positiven Kontrollseren ließen sich Antikörper gegen zumindest einen Teil des HSP60 nachweisen, in über der Hälfte aller Seren waren sogar Antikörper gegen den C- und den N-terminalen Teil zu finden. Bei den Seren der Rheumapatienten lag die Verteilung der Antikörper anders. Hier ließen sich für mehr als die Hälfte der Patienten überhaupt keine

Antikörper nachweisen und nur bei einem Viertel der Rheumatiker waren Antikörper gegen beide Fragmente des HSP60 zu finden.

Dieses Ergebnis widerspricht der Annahme, dass es nach einer *C. trachomatis* Infektion durch die Bildung von kreuzreagierenden HSP60-Antikörpern zur Induktion einer RA kommen kann, die sich in Rheumapatienten durch vermehrte Antikörper gegen chlamydiales HSP nachweisen ließen. Vielmehr weisen die Ergebnisse in Richtung einer gestörten effektiven Antwort des Immunsystems.

4.2.2.4 Fördert eine fehlende Bildung von HSP60 Antikörpern die Entstehung einer Persistenz der Chlamydien und dadurch das Entstehen Rheumatoider Arthritis?

Mit diesem den Erwartungen so widersprechenden Ergebnisse muss über die Reversion der eingangs aufgestellten These nachgedacht werden. Schützen Antikörper gegen chlamydiales HSP60 und damit vielleicht auch gegen humanes HSP60 vor der Entwicklung einer RA nach einer Infektion mit *Chlamydia trachomatis*? Überlegungen dazu werden im folgenden Abschnitt erläutert.

In synovialen Gewebe von Patienten mit durch *C. trachomatis* ausgelöster chronischer reaktiver Arthritis findet man diesen Keim meist in seiner persistierenden Form (Inman *et al.*, 2000; Villareal *et al.*, 2002). Die Vermutung liegt nahe, dass auch bei einer vermutlich Chlamydien-assoziierten Rheumatoiden Arthritis eine Persistenz der Chlamydien vorliegt und die beobachteten Schäden unter anderem durch die kontinuierliche Anwesenheit dieses Pathogens verursacht werden.

Bei der Analyse des Chlamydiengenoms wurden 3 HSP60-kodierende Genorte nachgewiesen (Stephens *et al.*, 1998), wobei neben dem im *groEL* Locus gelegenen Gen (Ct110) auch noch 2 weitere hsp60 Homologe Ct604 und Ct755 vorkommen. Das als Ct110 beschriebene HSP60 entspricht dabei dem HSP60, welches in vorliegender Arbeit verwendet wurde. Gérard *et al.* (2003) untersuchten die Expression dieser drei Gene während einer aktiven und einer ruhenden Infektion und stellten fest, dass diese drei Gene unabhängig voneinander exprimiert werden. Bei einer akuten Infektion werden alle drei HSP60-Homologe gebildet, am häufigsten ist Ct755, gefolgt von Ct605 nachzuweisen. Ct110 (*groEL*) das von uns untersuchte HSP60 spielt auch hier nur eine untergeordnete Rolle und erreicht seinen prozentual höchsten Anteil 18 Stunden nach der Infektion. Im persistenten Stadium werden Ct110 und Ct755 nur noch in verschwindend geringen Mengen exprimiert. Antikörper gegen Ct110 können also nur in den ersten Stunden einer Chlamydieninfektion gebildet werden und auch nur in diesem kurzen Zeitraum die Eliminierung des Pathogens effektiv unterstützen.

Dies wirft allerdings die Frage auf, in wie weit sich Antikörper gegen die HSP60-Homologe Ct755 und Ct605 in Seren von Rheumapatienten und Kontrollen nachweisen lassen und welche Rolle sie bei einer Immunantwort spielen.

Antikörper gegen humanes HSP60 wurden auch in Personen ohne Infektion gefunden. Dort scheinen sie der Eliminierung von abweichenden Zellen mit erhöhtem Stresslevel, wie er auch bei Infektionen auftritt, zu dienen (Srivastava und Maki, 1991; Marrack und Kapplar, 1993). Auch Anderton *et al.* (1995) heben den regulatorischen Aspekt von HSP-Autoantikörpern hervor. Mit diesen Überlegungen stellten Cohen und Young (1991) die These auf, dass Autoantikörper ein natürlicher Mechanismus sind, um Infektionen schneller und erfolgreicher zu bekämpfen. Dabei nahmen sie an, dass das Immunsystem die gestressten, verstärkt eigen HSP-produzierenden Zellen entweder über MHC präsentierte HSP-Peptide oder über an der Oberfläche präsentierte HSP erkennt. Interessanterweise ist nun gerade das untersuchte HSP60 (Ct110) jenes, welches von den 3 HSP60-Homologen in *Chlamydia trachomatis* die größte Übereinstimmung mit dem humanen HSP60 aufweist. Für Ct605 bzw. Ct755 beträgt die Ähnlichkeit mit dem humanen HSP nur 46 % bzw. 47 %. Für Ct110 wird jedoch eine Ähnlichkeit von 72 % erreicht. Es ist also wesentlich wahrscheinlicher, dass Antikörper gegen Ct110 auch mit humanem HSP60 kreuzreagieren können. Weiterhin zeigten Yi *et al.* (1993), dass auch während einer Infektion mit Chlamydien kreuzreaktive HSP-Antikörper nachgewiesen werden können. Zusammenfassend erlauben diese Erkenntnisse das Aufstellen einer neuen Theorie, die davon ausgeht, dass Antikörper, die gegen HSP60 von Chlamydien gebildet werden und das Auftreten von Autoantikörpern gegen HSP fördern, zusammen mit eben diesen Autoantikörpern entscheidend für eine schnelle Bekämpfung der Infektion mit Chlamydien sind und durch die Verhinderung eines Übergangs der Bakterien in die persistierende Phase auch einen positiven Einfluss auf die Entwicklung einer Rheumatoiden Arthritis ausüben können.

Zur Bestätigung dieser Theorie sind jedoch viele weitere Untersuchungen notwendig. Essentiell ist ein Nachweis von Autoantikörpern gegen humanes HSP60 in Personen mit Antikörpern gegen chlamydiales HSP. Weiterhin sollte in zukünftigen Analysen eindeutig zwischen einer akuten, einer persistierenden und einer überwundenen Infektion unterschieden werden. Wie bereits erwähnt, muss auch die Bedeutung der beiden anderen HSP60-Homologe der Chlamydien untersucht werden, um die Rolle der HSP60-Antikörper bei der Entstehung einer Rheumatoiden Arthritis nach Chlamydieninfektion umfassend deuten zu können.

4.2.2.5 N- und C-terminaler Teil des HSP60

Abschließend soll auch noch auf die Verteilung der Anti-HSP-Antikörper auf den N- und den C-terminalen Teil dieses Proteins eingegangen werden. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung der Antikörper auf den N- und C-terminalen Teilen des HSP60 (HSP-N ca. 45,0 % [beide Gruppen] und HSP-C 65,0 % [Kontrollen] bzw. 50 % [Rheumatiker]) nachgewiesen und so ist es nicht möglich, dem C- oder N-terminalen Ende eine stärkere Prädisposition zur Induktion von kreuzreaktiven Antikörper zuzuweisen. HSP-C-Antikörper waren etwas häufiger als HSP-N-Antikörper, was sich aber bereits durch die 1990 von Cerrone *et al.* erwähnte höhere Antigenität des C-terminalen Proteinteils erklären lässt.

Vergleicht man die Proteinsequenzen der HSP-Fragmente mit den Sequenzen anderer bakterieller HSP60, so erkennt man eine relativ hohe Übereinstimmung zu gram-negativen Bakterien, die bei HSP-C (rund 77 %) stets etwas höher liegt als bei HSP-N (rund 70 %). Erstaunlich niedrig ist die Übereinstimmung mit dem Hitzeschockprotein von *Chlamydia pneumoniae* (43 %). Für gram-positive Bakterien gibt es nur mit HSP-N eine Übereinstimmung. Die Hitzeschockproteine dieser Bakterien sind wesentlich kleiner und greifen nicht auf das Gebiet des C-terminalen Teils über, so dass für HSP-C keine Übereinstimmungen gefunden werden konnten.

Chlamydiales und mykobakterielles HSP60 sind sich zu 68 % ähnlich und auch das als protektiv beschriebene mykobakterielle Epitop (Anderton *et al.*, 1995) der Aminosäuren 256-265 haben beide gemeinsam. Für das in dieser Region gelegene Peptid GEALATLVVN gibt es auch eine Übereinstimmung mit dem humanen HSP60. Im Einklang mit den Schlussfolgerungen des vorangegangenen Abschnittes ist ebenfalls zu bemerken, dass diese Aminosäurenfolge nur im hier untersuchten Ct110 Homolog, jedoch nicht in den HSP60 Homologen Ct755 und Ct604 vorhanden ist. Dieses Epitop liegt an der von uns festgelegten Grenze von N- und C-terminalem Proteinteil. Bis auf die erste Aminosäure befindet sich dieses Peptid auf dem C-terminalen Teil. Durch diese Spaltung kann nicht ausgeschlossen werden, dass einige der Antikörper, die mit dieser interessanten Region reagieren würden, weder an dem C- noch an den N-terminalen Teil binden konnten und einer Detektion somit entgingen. Weitere Untersuchungen zu Antikörpern, die in dieser Region binden (Teilung des HSP60 Proteins in N-, C-terminalen und Mittelteil), könnten daher von Interesse sein.

4.2.2.6 Die Bedeutung von bakteriellen Antigenen bei der Rheumatoiden Arthritis

Die Auswertung der beiden in dieser Arbeit untersuchten Mechanismen zur Beteiligung von Bakterien an der RA zeigen noch einmal deutlich, dass viele Faktoren bei der Ätiologie dieser Erkrankung eine Rolle spielen können und es wahrscheinlich nicht möglich sein wird, ein einzelnes Pathogen als RA-Auslöser zu identifizieren. So kann sowohl eine Induktion eines Arthritisschubes durch Superantigen der Streptokokken, als auch ein Auslösen der Erkrankung durch eine unzulängliche Immunantwort nach Chlamydieninfektion oder eine Antikörperbildung gegen Vimentin eine Rolle bei dem sehr individuellen Verlauf der Krankheit spielen.

Diese Diversität sollte auch bei der Entwicklung von Rheumatherapeutika weiter berücksichtigt werden. Denn es ist zweifelhaft, dass für eine Erkrankung die so unterschiedliche Entwicklungsverläufe aufweist, eine einzelne Lösung zur Heilung aller Varianten verwendet werden kann.

5 Zusammenfassung

Die Rheumatoide Arthritis ist eine komplexe Erkrankung mit Autoimmuncharakter. Die Ursachen, welche zur Entstehung einer RA führen, sind vielschichtig. Neben einer genetischen Veranlagung der Patienten werden auch äußere Einflüsse wie Infektionen als mögliche Auslöser diskutiert. Die Beteiligung von Pathogenen an Autoimmunerkrankungen kann unter anderem durch eine Induktion von kreuzreaktiven Antikörpern gegen körpereigene Strukturen, aber auch durch eine Hyperaktivierung des zellulären Immunsystems durch Superantigene erfolgen. Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob Chlamydien und Streptokokken durch Induktion bakterieller Kreuzreaktionen oder auch durch die unkontrollierte Aktivierung von T-Zellen durch Superantigene in der Lage sind, an der Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis beteiligt sein könnten.

Superantigene könnten durch die Aktivierung bereits vorhandener autoreaktiver T-Zellen den Verlauf einer Rheumatoiden Arthritis beeinflussen. Auch das Dominieren von Zellen des Th1-Subtyps sowohl in der RA als auch nach SAG-Gabe lässt auf einen solchen Zusammenhang schließen. Wir untersuchten die Induktion eines Arthritisschubes nach intraartikulärer und intravenöser Superantigengabe in Mäusen mit bereits ausgelöster Antigen-induzierter Arthritis. Dabei wurden verschiedene Superantigene der Gruppe C- und das SPE-G der Gruppe G-Streptokokken getestet. Mit SPE-G, welches auch in höheren Konzentrationen verwendet wurde, konnte ein Arthritisschub ausgelöst werden, der durch Anschwellen der Kniegelenke bzw. durch histologische Veränderungen in selbigen messbar war. Damit können auch die Gruppe G-Streptokokken zu den möglichen Auslösern eines Arthritisschubes durch ihre Superantigene gezählt werden. Zusätzlich wurde in der Folge des Arthritisschubes ein Abklingen der chronischen Arthritis Symptome festgestellt. Eine Kombination aus Induktion und Reduktion der Arthritis durch Superantigene ist bisher nicht beschrieben worden und wirft die Frage nach dem Wirken mehrmaliger Superantigenexposition und nach der Langzeitwirkung anderer schubauslösender Superantigene auf, die es in der Zukunft zu beantworten gilt.

Neben Superantigenen könnten auch Antikörper gegen hochkonservierte oder kreuzreaktive Strukturen auf den Proteinen von Pathogenen durch die Induktion von Autoantikörpern eine ursächliche Rolle bei der Entstehung der Rheumatoiden Arthritis spielen. Um diese Theorie zu überprüfen, wurde in den Seren von Rheumapatienten nach Antikörpern gegen solche Regionen gesucht und mit den Seren einer Kontrollgruppe verglichen. Gesucht wurde nach

Antikörpern gegen ein Vimentinfragment und ein Fragment des M-Proteins der Gruppe C-Streptokokken. Beide Fragmente besitzen eine homologe Region mit coiled-coil Struktur, die sich zur Bildung kreuzreaktiver Antikörper eignet. Außerdem wurde nach Antikörpern gegen das hochkonservierte HSP60 von *Chlamydia trachomatis* gesucht, einem Keim mit zunehmender klinischer Relevanz und einer Tendenz zur Persistenz. Zusätzlich wurden die Seren zur Bestimmung des Infektionsstatus mit *C. trachomatis* mit einem kommerziellen Test auf IgG-Antikörper gegen das Hauptmembranprotein (MOMP) gescreent. Diese Antikörper waren in den Seren von Rheumatikern etwas häufiger nachweisbar als in den Seren der Kontrollgruppe (nach Angleich der Altersgruppen). Antikörper gegen chlamydiales HSP60 waren allerdings bei der Kontrollgruppe häufiger zu finden als in der Gruppe der Rheumatiker. In den Fällen, in denen MOMP-IgG nachgewiesen wurde, waren sogar in allen Kontrollseren Antikörper gegen HSP60 vorhanden, in den meisten Rheumaseren jedoch nicht. Während eine Infektion mit Chlamydien das Risiko, eine Rheumatoide Arthritis zu entwickeln, nur minimal erhöht, scheint das Versagen, Antikörper gegen chlamydiales HSP60 zu bilden, mit einer starken Zunahme des Erkrankungsrisikos einherzugehen. Inwieweit kreuzreagierende Antikörper gegen humanes HSP60 dabei von Bedeutung sind, bleibt offen. Es ist jedoch anzunehmen, dass sie, da schon Antikörper gegen chlamydiales HSP60 bei Rheumatikern eher selten auftreten, keine entscheidende Rolle beim Auslösen einer RA übernehmen.

Auch die kreuzreaktiven Antikörper, die sich nach einer Infektion mit Gruppe C-Streptokokken mit Kreuzerkennung zwischen dem M-Protein und Vimentin bilden, scheinen von untergeordneter Bedeutung bei der Entstehung der RA zu sein, da sie annähernd gleichhäufig in Rheuma- und Kontrollgruppe gefunden wurden. Dass diese Kreuzreaktionen vereinzelt für das Auftreten einer Rheumatoiden Arthritis verantwortlich sind, ist durchaus möglich. Dass sie für Patienten mit Rheumatoider Arthritis eine entscheidende Rolle spielen, kann aber ausgeschlossen werden. Dies zeigt, dass die meisten der menschliche Körper in der Regel durchaus in der Lage ist, die Schädigung des eigenen Gewebes durch eventuell vorhandene autoimmune Antikörper zu verhindern. Der Nachweis dieser Antikörper eignet sich damit auch nicht zur Etablierung eines zusätzlichen Tests in der Rheumadiagnostik.

Die vorliegende Arbeit bestätigte die komplexe Ätiologie der Rheumatoiden Arthritis und zeigte, dass die Antikörperbildung gegen hochkonservierte oder kreuzreaktive Strukturen im Falle von chlamydialem HSP60 und MMC-Protein nicht bzw. kaum zum Risiko, an RA zu

erkranken, beiträgt. Deutlich wurde auch, dass durch serologische Untersuchungen die Ursachen für die Entstehung der RA bei einzelnen Patienten nicht zu klären ist.

Anders verhält es sich mit Superantigenen: Mit SPE-G der Gruppe G-Streptokokken ließ sich zumindest ein kurzzeitiger akuter Arthritisschub in der Maus induzieren. Inwieweit kreuzreaktive Antikörper für humanes HSP60 im Zusammenspiel mit Superantigenen und vorhandenen Autoantikörpern bei der Entwicklung der RA von Bedeutung sind bleibt zu untersuchen.

6 Literaturverzeichnis

Acha-Orbea H, MacDonald HR. Superantigens of mouse mammary tumor virus.
Annu Rev Immunol 13: 459-486, 1995;

Adorini L, Guery JC, Trembleau S. Manipulation of the Th1/Th2 cell balance: an approach to treat human autoimmune diseases?
Autoimmunity 23: 53-68, 1996

Alspaugh M, Henle G, Lennette E, Henle W. Elevated levels of antibodies to Epstein-Barr virus in sera and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis.
J Clin Invest 67(4): 1134-1140, 1981

Alcover A, Ramirez-Lafita F, Hernandez C, Nieto A, Avila J. Antibodies to vimentin intermediate filaments in sera from patients with SLE and RA: quantitation by solid phase radioimmunoassay.
J Rheumatol 12(2): 233-236, 1985

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs
Nucleic Acids Res 25: 3389-3402, 1997

Anderton SM, von der Zee R, Prakken ABJ, Noordzij A, van Eden W. Activation of T-cells recognizing self 60 kDa heat shock protein can protect against experimental arthritis.
J Exp Med 181: 943-952, 1995

Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Coopers NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthras HS. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis.
Arthritis Rheum 31: 315-324, 1988

Asaga H, Yamada M, Senshu T: Selective deimination of vimentin in calcium ionophore-induced apoptosis of mouse peritoneal macrophages.
Biochem Biophys Res Commun 243: 641-646, 1998

Asaka M, Kudo M, Kato M, Sugiyama T, Taketa H. Long-term Helicobacter pylori infection – from gastritis to gastric cancer.
Aliment Pharmacol Ther 12: 9-15, 1998

Auger I and Roudier J. HLA-DR and the development of rheumatoid arthritis.
Autoimmunity 26: 123-128, 1997

Baker BS, Brown DW, Fischetti VA, Ovigine JM, Porter W, Powles A, Fry L. Skin T cell proliferative response to M protein and other cell wall and membrane proteins of group A streptococci in chronic plaque psoriasis.
Clin Exp Immunol 124(3): 516-521, 2001

Barson WJ. Group C streptococcal osteomyelitis.
J Pediatr Orthop 6(3): 346-348, 1986

Bas S, Kvien TK, Buchs N, Fulpius T, Gabay C. Lower level of synovial fluid interferon-gamma in HLA-B27 positive than in HLA-B27 negative patients with *Chlamydia trachomatis* reactive arthritis.
Rheumatology 42(3): 461-467, 2003

Bas S, Perneger TV, Seitz M, Tiercy JM, Roux-Lombard P, Guerne PA. Diagnostic tests for rheumatoid arthritis: comparison of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, anti-keratin antibodies and IgM rheumatoid factors.
Rheumatology 41: 809-814, 2002

Bayer EA, Wilchek M. Biotin-binding proteins: overview and prospects.
Methods Enzymol 184: 49-51, 1990

- Bergdoll MS. The staphylococcal enterotoxins—an update.
Jelaszewics J, Ed. The staphylococci. New York: Gustav Fisher Verlag, 247–266, 1985
- Bessen D, Jones KF, Fischetti VA. Evidence for two distinct classes of streptococcal M protein and their relationship to rheumatic fever.
J Exp Med 169: 269-283, 1989
- Bisno AL, Collins CM, Turner JC. M proteins of group C streptococci isolated from patients with acute pharyngitis.
J Clin Microbiol 34(10): 2511-2515, 1996
- Blankenberg-Sprengels SH, Fiedler M, Feltkamp TE, Tiwana H, Wilson C, Ebringer A. Antibodies to *Klebsiella pneumoniae* in Dutch patients with ankylosing spondylitis and acute anterior uveitis and to *Proteus mirabilis* in rheumatoid arthritis.
J Rheumatol 25: 743-747, 1998
- Boog CJP, de Graeff-Meeder ER, Lucassen MA, van der Zee, Voorhorst-Ogink MM, van Kooten PJ, Geuze HJ, van Eden W. Two monoclonal antibodies generated against human hsp60 show reactivity with synovial membranes of patients with juvenile chronic arthritis.
J Exp Med 175: 1805, 1992
- Bremell T, Tarkowski A. Preferential induction of septic arthritis and mortality by Superantigen-producing Staphylococci.
Infect Immun 63(10): 4185-4187, 1995
- Cannon GW, Cole BC, Ward JR, Smith JL, Eichwald EJ. Arthritogenic effects of Mycoplasma arthritidis T cell mitogen in rats.
J Rheumatol 15(5): 735-741, 1988.
- Carlin JM, Borden EC, Byrne GI. Interferon-induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity inhibits Chlamydia psittaci replication in human macrophages.
J Interferon Res 9(3): 329-337, 1989
- Castro F, Acevedo E, Ciusani E, Angulo JA, Wollheim FA, Sandberg-Wollheim M. Tumour necrosis factor microsatellites and HLA-DRB1*, HLA-DQA1*, and HLA-DQB1* alleles in Peruvian patients with rheumatoid arthritis.
Ann Rheum Dis 60(8): 791-795, 2001.
- Cates W Jr, Rolfs RT Jr, Aral SO. Sexually transmitted diseases, pelvic inflammatory disease, and infertility: an epidemiologic update.
Epidemiol Rev 12: 199-220, 1990
- Cerrone MC, Ma JJ, Stephens RS. Cloning and sequence of the gene for heat shock protein 60 from Chlamydia trachomatis and immunological reactivity of the protein.
Infect Immun 59(1): 79-90, 1991
- Chesney PJ, Bergdoll MS, Davis JP. The disease spectrum, epidemiology and etiology of toxic shock syndrome.
Annu Rev Microbiol 38: 315-338, 1984
- Choi Y, Kappler JW, Marrack PA. Superantigen encoded in the open reading frame of the 3' long terminal repeat of mouse mammary tumor virus.
Nature 350: 203-207, 1991
- Cohen IR. Autoimmunity to hsp65 and the immunologic paradigm.
Adv Intern Med 37: 295–311, 1992
- Cohen IR, Young DB. Autoimmunity, microbial immunity and the immunological homunculus.
Immunol Today 12(4): 105-110, 1991

- Cole B, Ahmed E, Araneo BA, Shelby J, Kamerath C, Wie S, McCall S, Atkin C. Immunomodulation in vivo by the *Mycoplasma arthritidis* Superantigen, MAM. *Clin Infect Dis* 17: 163-169, 1993
- Cole BC, Atkin CL. The *Mycoplasma arthritidis* T-cell mitogen, MAM: a model superantigen. *Immunol Today* 2(8): 271-276, 1991
- Cole BC, Griffiths MM. Triggering and exacerbation of autoimmune arthritis by the *Mycoplasma arthritidis* superantigen MAM. *Arthritis Rheum* 36: 994-1002, 1993
- Conrad B, Weissmahr RN, Boni J, Arcari R, Schubach J, Mach B. A human enogenous retroviral superantigen as candidate in autoimmune gene in type I diabetes. *Cell* 90: 303-313, 1997
- Cox CJ, Kempell KE, Gaston JS. Investigation of infectious agents associated with arthritis by reverse transcription PCR of bacterial rRNA. *Arthritis Res Ther* 5(1): 1-8, 2003
- Cunnane G, Doran M, Bresnihan B. Infections and biological therapy in rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 17(2): 345-363, 2003
- Cunningham MW, McCormack JM, Fenderson PG, Ho MK, Beachey EH, Dale JB. Human and murine antibodies cross-reactive with streptococcal M protein and myosin recognize the sequence GLN-LYS-SER-LYS-GLN in M protein. *J Immunol* 143: 2677-2683, 1989
- de Graeff-Meeder ER, van Eden W, Rijkers GT, Prakken BJ, Kuis W, Voorhorst-Ogink MM, van der Zee R, Schuurman HJ, Helders PJ, Zegers BJ. Juvenile chronic arthritis: T cell reactivity to human HSP60 in patients with a favorable course of arthritis. *J Clin Invest* 95(3): 934-940, 1995
- Degnan B, Taylor J, Hawkes C, O'Shea U, Smith J, Robinson JH, Kehoe MA, Boylston A, Goodacre JA. *Streptococcus pyogenes* type 5 M protein is an antigen, not a superantigen, for human T cells. *Hum Immunol* 53(2): 206-215, 1997
- Dellabonda B, Peccoud J, Kappler J, Marrack P, Benoit C, Matthis D. Superantigens interact with MHC class II molecules outside of the antigen binding groove. *Cell* 62: 1115-1121, 1990
- Diedrich JF, Carp RI, Haase AT. Increased expression of heat shock protein, transferrin, and beta 2-microglobulin in astrocytes during scrapie. *Microb Pathog* 15(1): 1-6, 1993
- Ebringer A. The link between genes and disease. *New Scientist* 79: 865-867, 1978
- Ebringer A, Thorpe C, Pirt J, Wilson C, Cunningham P, Ettelaie C. Bovine spongiform encephalopathy: is it an autoimmune disease due to bacteria showing molecular mimicry with brain antigens? *Environ Health Perspect* 1997 105(11): 1172
- Eder M, Gedik P (eds.). *Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie*. 33. Auflage, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York. 855-857, 1990
- Eerola E, Möttönen T, Hannonen P, Luukkainen R, Kantola I, Vuori K, Tuominen J, Toivanen P. Intestinal flora in early rheumatoid arthritis. *Brit J Rheumatol* 33: 1030-1038, 1994

- El-Gabalawy HS, Wilkins JA. Anti-Sa antibodies: prognostic and pathogenetic significance to rheumatoid arthritis.
Arthritis Res Ther 6(2): 86-89, 2004
- Ellis RW. Infection and coronary heart disease.
J Med Microbiol 46: 535-539, 1997
- Emmrich F, Kaufmann SH. Human T-cell clones with reactivity to *Mycobacterium leprae* as tools for the characterization of potential vaccines against leprosy.
Infect Immun 51(3): 879-883, 1986
- Feige U, van Eden W. Infection, autoimmunity and autoimmune disease.
Experientia 77: 359-373, 1996
- Fischetti VA, Pancholi V, Schneewind O. Conservation of a hexapeptide sequence in the anchor region of the surface proteins of gram positive cocci.
Mol Microbiol 4: 1603-1606, 1990
- Fleischer B, Gerardy-Schahn R, Metzroth B, Carrel S, Verlach D, Köhler W. A conserved mechanism of T cell stimulation by microbial toxins. Evidence for different affinities of T cell receptor-toxin interaction.
J. Immunol 146: 11-17, 1991
- Ford AL, Britton WJ, Armati PJ. Schwann cells are able to present exogenous mycobacterial hsp70 to antigen-specific T lymphocytes.
J Neuroimmunol 43: 151-159, 1993
- Franch A, Castellote C, Vila JL, Vilaro S, Castell M. Anticytoskeletal autoantibody development in adjuvant arthritis.
J Rheumatol 21: 489-497, 1994
- Garcia-Lozano JR, Gonzalez-Escribano MF, Valenzuela A, Garcia A, Nunez-Roldan A. Association of vitamin D receptor genotypes with early onset rheumatoid arthritis.
Eur J Immunogenet 28(1): 89-93, 2001
- Geyer A, Roth A, Vetterman S, Günther E, Groth A, Straube E, Schmidt K-H. M-protein of a *Streptococcus dysgalactiae* human wound isolate shows multiple binding to different plasma proteins and shares epitopes with keratin and human cartilage.
FEMS Immunol Med Microbiol 26: 11-24, 1999.
- Geyer A, Schmidt K-H. Genetic organisation of the M protein region in human isolates of group C and G streptococci: two types of multigene regulator-like (mgrC) regions.
Mol Gen Genet 262(6): 965-975, 2000
- Gerad HC, Whittum-Hudson JA, Schumacher HR, Hudson AP. Differential expression of three *Chlamydia trachomatis* hsp60-encoding genes in active vs. persistent infections.
Microb Pathog 36(1): 35-39, 2004
- Goldbach Mansky R, Lee J, McCoy A, Hoxworth J, Yarboro C, Smolen JS, Steiner G, Rosen A, Zhang C, Menard HA, Zhou ZJ, Palosuo T, Van Venrooij WJ, Wilder RL, Klippel JH, Schumacher HR Jr, El-Gabalawy HS. Rheumatoid arthritis associated autoantibodies in patients with synovitis of recent onset.
Arthritis Res 2: 236-243, 2000
- Gomez FJ, Woodward EO, Pilcher-Roberts R, Gibbons RS, Deepe GS. V β 6⁺ and V β 4⁺ T cells exert cooperative activity in clearance of secondary infection with *Histoplasma capsulatum*.
J Immunol 166: 2855-2862, 2001
- Gonzalez-Escribano MF, Rodriguez R, Valenzuela A, Garcia A, Garcia-Lozano JR, Nunez-Roldan A. CTLA4 polymorphisms in Spanish patients with rheumatoid arthritis.
Tissue Antigens 53(3): 296-300, 1999

- Griessmann GE, McCormick DJ, Lennon VA. An avidin-biotin-peroxidase assay to detect synthetic peptides bound to polystyrene plates.
J Immunol Methods 138: 29-29, 1991
- Griffiths DJ, Cooke SP, Herve C, Rigby SP, Mallon E, Hajeer A, Lock M, Emery V, Taylor P, Pantelidis P, Bunker CB, du Bois R, Weiss RA, Venables PJ. Detection of human retrovirus 5 in patients with arthritis and systemic lupus erythematosus.
Arthritis Rheum 42(3): 448-454, 1999
- Hasunuma T, Sumida T, Nishioka K. Human T cell leukemia virus type-I and rheumatoid arthritis.
Int Rev Immunol 17: 291-307, 1998
- Hemmerich P, Neu E, Macht M, Peter HH, Krawinkel U. von Mikercz A. Correlation between chlamydia infection and autoimmune response: molecular mimicry between RNA polymerase major sigma subunit from *Chlamydia trachomatis* and human L7.
Eur J Immunol 28: 3857-3866, 1998
- Herrmann T, Baschieri S, Lees RK, MacDonald HR. In vivo responses of CD4+ und CD8+ cells to bacterial superantigens.
Eur J Immunol 22: 1935-1938, 1992
- Herz U, Rückert R, Wollenhaupt K, Tschernig T, Neuhaus-Steinmetz U, Pabst R, Renz H. Airway exposure to bacterial superantigen (SEB) induces lymphocyte-dependent airway inflammation associated with increased airway responsiveness- a model for non-allergic asthma.
Eur J Immunol 29: 1021-1031, 1999
- Hill JA, Southwood S, Sette A, Jevnikar AM, Bell DA, Cairns E. Cutting edge: the conversion of arginine to citrulline allows for a high-affinity peptide interaction with the rheumatoid arthritis-associated HLA-DRB1*0401 MHC class II molecule.
J Immunol 171(2): 538-541, 2003
- Hoeksma A, Winkler KC. The normal flora of the nose in twins.
Acta Leidensia 32: 123-133, 1963
- Honore B, Madsen P, Basse B, Andersen A, Walbum E, Celis JE, Leffers H. Nucleotide sequence of cDNA covering the complete coding part of the human vimentin gene.
Nucleic Acids Res 18(22): 6692, 1990
- Horstmann RD, Sievertsen HJ, Knobloch J, Fischetti VA. Antiphagocytic activity of streptococcal M-protein: selective binding of complement control protein factor H.
Proc Natl Acad Sci USA 85: 1657-1661, 1988
- Hueber W, Hassfeld W, Smolen JS, Steiner G. Sensitivity and specificity of anti-Sa autoantibodies for rheumatoid arthritis.
Rheumatology 38: 155-159, 1999
- Inman RD, Witthum-Hudson JA, Schumacher HR, Hudson AP. Chlamydia-associated arthritis.
Curr Opin Rheumatol 12: 254-262, 2000
- Ishii KK, Takahashi Y, Kaku M, Sasaki T. Role of human parvovirus B19 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis.
Jpn J Infect Dis 52(5): 201-207, 1999
- Ito Y, Abe J, Yoshino K, Takeda T, Kohsaka T. Sequence analysis of the gene for a novel superantigen produced by *Yersinia pseudotuberculosis* and expression of the recombinant protein.
J Immunol 11: 5896-906, 1995
- Jones DB, Coulson AFW, Duff GW. Sequenzhomologies between hsp60 and autoantigens.
Immunol Today 14: 115-118, 1993

- Kageyama Y, Koide Y, Nagata T, Uchijima M, Yoshida A, Arai T, Miura T, Miyamaoto C, Nagano A. Toxic Shock Syndrome Toxin-1 accelerated collagen-induced arthritis in mice.
J Autoimmun 16: 125-131, 2001
- Kalman, B, Lublin FD, Lattime E, Joseph J, Knobler RL. Effects of staphylococcal enterotoxin B on T cell receptor V utilization and clinical manifestations of experimental allergic encephalomyelitis.
J Neuroimmunol 45: 83-88, 1993
- Kaplan MH, Meyeserian M. An immunological cross reaction between group A streptococcal cells and human heart tissue.
Lancet 1: 706-710, 1962
- Kappler JW, Kotzin B, Herron L, Gelfand EW, Bigler RD, Boylston A, Carrel S, Posnett DN, Choi Y, Marrack P. V β -specific stimulation of human T cells by staphylococcal toxins.
Science 244: 811-813, 1990
- Kaufmann SHE. Heat-shock proteins: a link between rheumatoid arthritis and infection?
Curr Opin Rheumatol 2(3): 430-435, 1990
- Kaufmann SHE. Heat shock proteins and the immune response.
Immunol Today 11: 129-136, 1990
- Kawabe Y, Ochi A. Programmed cell death and extrathymic reduction of V β ⁺ CD4⁺ T cells in mice tolerant to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B.
Nature 349: 245-248, 1991
- Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM. Medizinische Mikrobiologie 9. Auflage
Georg Thieme Verlag, 1998
- Keiser P, Campbell W. 'Toxic strep syndrome' associated with group C *Streptococcus*.
Arch Intern Med 152(4): 882-884, 1992
- Kim JM, Weisman MH. When does rheumatoid arthritis begin and why do we need to know?
Arthritis Rheum 43: 473-484, 2000
- Koch J, Kirschner W, Schäfer A. Bestimmung der Prävalenz genitaler HPV- und Chlamydia-trachomatis-Infektionen in einem repräsentativen Querschnitt der weiblichen Normalbevölkerung Berlin.
Infektionsepidem Fors II: 1-7, 1997
- Kotb M. Bacterial pyrogenic exotoxins as superantigens.
Clin Microbiol Rev 8(3): 411-426, 1995
- Kotzin BL, Leung DYM, Kappler J, Marrack P. Superantigens and their potential role in human disease.
Adv Immunol 54: 99-166, 1993
- Kraft M, Flisinger S, Krämer K-L, Kabelitz D, Hänsch GM, Schoels M. Synovial fibroblasts as target cells for staphylococcal enterotoxin-induced T-cell cytotoxicity.
Immunology 93(1):20-25, 1998
- Krakauer T. Immune response to staphylococcal superantigens.
Immunol Res 20(2): 163-173, 1999
- Kraus W, Beachey EH. Renal autoimmune epitope of group A streptococci specified by M protein tetrapeptide: Ile-Arg-Leu-Arg.
Proc Natl Acad Sci USA 85: 4516-4520, 1988
- Krishnan E. Smoking, gender and rheumatoid arthritis-epidemiological clues to etiology. Results from the behavioral risk factor surveillance system.
Joint Bone Spine 70(6): 496-502, 2003

- Kroot EJ, de Jong BA, van Leeuwen MA, Swinkels H, van den Hoogen FH, van't Hof M, van de Putte LB, van Rijswijk MH, van Venrooij WJ, van Riel PL. The prognostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with recent onset rheumatoid arthritis.
Arthritis Rheum 43: 1831–1835, 2000
- Kühnemund O, Schumacher M, Casaretto M, Holm SE, Lütticken R. Estimation of type specific anti-streptococcal M-protein antibodies with biotinylated peptides in human sera.
APMIS 106: 288-292, 1998
- Kumar V, Fatema A, Sercarz E, Miller A. Regulatory T cells specific for the same framework 3 region of the V 8.2 chain are involved in the control of collagen II-induced arthritis and experimental autoimmune encephalomyelitis.
J Exp Med 185(10): 1725-1733, 1997
- Kuryliszyn-Moskal A. Immunopathogenesis of inflammatory arthritis: lessons from Lyme and rheumatoid arthritis.
Prezegl Epidemiol 56(1): 67-72, 2002
- Lancefield RC. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci.
J Exp Med 57: 571-595, 1933
- Launois P, N'Diaye M, Sarthou JL, Millan J, Bach MA. Anti-peripheral nerve antibodies in leprosy patients recognize an epitope shared by the *M. leprae* 65 kDa heat shock protein.
J Autoimmun 5: 745-757, 1992
- Li GC, Laszlo A. Thermotolerance in mammalian cells: a possible role for the heat shock proteins. Changes in Eukariotic Gene Expression in Response to Enviromental Stress. 349-371, 1985
- Li PL, Tiedemann RE, Moffat SL, Fraser JD. The superantigen streptococcal pyrogenic exotoxin C (SPE-C) exhibits a novel mode of action.
J Exp Med 186: 375–383, 1997.
- Lisse JR. Does rheumatoid factor always mean arthritis?
Postgrad Med 94(6): 133-134, 1993
- Little CS, Hammond CJ, MacIntyre A, Balin BJ, Appelt DM. Chlamydia pneumoniae induces Alzheimer-like amyloid plaques in brains of BALB/c mice.
Neurobiol Aging 25(4): 419-429, 2004
- Litton MJ, Sander B, Murphy E, O'Garra A, Abrams JS. Early expression of cytokines in lymph nodes after treatment in vivo with Staphylococcus enterotoxin B.
J Immunol Methods 175: 47-58, 1994
- Linquist S. Regulation of protein synthesis during heat shock.
Nature 293: 311-314, 1981
- Machold KP, Stamm TA, Eberl GJ, Nell VK, Dunky A, Uffmann M, Smolen JS. Very recent onset arthritis--clinical, laboratory, and radiological findings during the first year of disease.
J Rheumatol 29(11): 2278-2287, 2002
- Maetzel A, Li LC, Pencharz J, Tomlinson G, Bombardier C. The economic burden associated with osteoarthritis, rheumatoid arthritis, and hypertension: a comparative study.
Ann Rheum Dis 63(4): 395-401, 2004
- Marrack P, Kappler JW. How the immune system recognizes the body.
Sci Am 269(3): 80-3, 86-89, 1993
- Mattei D, Ozaki LS, Pereira da Silva L. A Plasmodium falciparum gene encoding a heat shock-like antigen related to the rat 78 kD glucose-regulated protein.
Nucleic Acids Res 16: 5204-5208, 1988

- Mayet WJ, Hermann E, Bachmann M, Manns M, Meyer zum Buschenfelde KH. Correlation of anti-cytoskeleton antibody activities in synovial fluid with interleukin-6 in patients with osteoarthritis and inflammatory joint disease.
Klin Wochensh 68(13): 685-691, 1990
- Meyer O. Parvovirus B19 and autoimmune diseases.
Joint Bone Spine. 70(1): 6-11, 2003
- Meyer JM, Han J, Moxley G. Tumor necrosis factor markers show sex-influenced association with rheumatoid arthritis.
Arthritis Rheum 44(2): 286-95, 2001
- Miethke T, Wahl C, Heeg K, Echtenacher B, Krammer PH, Wagner H. T cell-mediated lethal shock triggered in mice by superantigen staphylococcal enterotoxin B: critical role fo tumor necrosis factor.
J Exp Med 175: 91-98, 1992
- Miltenburg AMM, van Laar JM, de Kuiper R, Daha MR, Breedveld FC. T cells cloned from human rheumatoid synovial membran functionally represented the Th1 subset.
Scand J Immunol 35: 603-610, 1992
- Mohr DN, Feist DJ, Washington JA2nd, Hermans PE. Infections due to group C-streptococci in man.
Am J Med 66(3): 450-456, 1979
- Morgan AW, Griffiths B, Ponchel F, Montague BM, Ali M, Gardner PP, Gooi HC, Situnayake RD, Markham AF, Emery P, Isaacs JD. Fcgamma receptor type IIIA is associated with rheumatoid arthritis in two distinct ethnic groups.
Arthritis Rheum 43(10): 2328-2334, 2000
- Mulcahy B, Waldron-Lynch F, McDermott MF, Adams C, Amos CI, Zhu DK, Ward RH, Clegg DO, Shanahan F, Molloy MG, O'Gara F. Genetic variability in the tumor necrosis factor-lymphotoxin region influences susceptibility to rheumatoid arthritis.
Am J Hum Genet. 59(3): 676-683, 1996
- Müller-Alouf H, Proft T., Zollner TM, Gerlach G, Champagne E, Desreumaux P, Fitting Catherine, Geoffroy-Fauvet C, Alouf JE, Cavaillon J-M. Pyrogenicity and cytokine-inducing properties of *Streptococcus pyogenes* superantigens: comparative study of streptococcal mitogenic exotoxin Z and pyrogenic exotoxin A.
Infect Immun 69(6): 4141-4145, 2001
- Munk ME, Schoel B, Kaufmann SH. T cell responses of normal individuals towards recombinant protein antigens of Mycobacterium tuberculosis.
Eur J Immunol 18(11): 1835-1838, 1988
- Nene V, Dunne DW, Johnsson KW, Taylor DW, Cordingley JS. Sequence and expression of a major egg antigen from *Schistosoma mansoni*. Homologies to heat shock proteins and alpha-crystallins.
Mol Biochem Parasitol 21: 179-188, 1986
- Nieman DC, Nehlsen-Cannarella SL, Henson DA, Koch AJ, Butterworth DE, Fagoaga OR, Utter A. Immune response to exercise training and/or energy restriction in obese women.
Med Sci Sports Exerc 30: 679-686, 1998.
- Osung OA, Chandra M, Holborow EJ. Antibody to intermediate filaments of the cytoskeleton.
Ann Rheum Dis 41(1): 69-73, 1982
- Paavon J. Pelvic inflammatory disease.
Sex Trans Dis 16: 747-755, 1998
- Paliard X, West SG, Lafferty JA, Clements JR, Kappler JW, Marrack P, Kotzin BL. Evidence for the effect of a superantigen in rheumatoid arthritis.
Science 253: 325-328, 1991

- Palosuo T, Tilvis R, Strandberg T, Aho K. Filaggrin related antibodies among the aged.
Ann Rheum Dis 62: 261-263, 2003
- Panayi GS, Lanchbury JS, Kingsley GH. The importance of the T cell in initiating and maintaining the chronic synovitis of rheumatoid arthritis.
Arthritis Rheum 35: 729-735, 1992
- Perez-Casal J, Okada N, Caparon M, Scott JR. Role of the conserved C repeat region of the M protein of *Streptococcus pyogenes*.
Mol Microbiol 15: 907-916, 1995
- Peter JC, Briand JP, Hoebeke J. How biotinylation can interfere with recognition: a surface plasmon resonance study of peptide-antibody interactions.
J Immunol Methods 274: 149-158, 2003
- Petersen EE., Obermann K, Graf von der Schulenburg JM. Gesundheitsvorsorge durch Chlamydienscreening.
Geburtsh u Frauenheilk 58: 408-414, 1998
- Petibois C, Cazorla G, Déléris G. The biological and metabolic adaptations to 12 months training in elite rowers.
Int J Sport Med 24: 36-42, 2003
- Pohlert D, Nissler K, Frey O, Simon, Petrow PK, Kinne RW, Bräuer R. Anti-CD4 monoclonal antibody treatment in acute and early chronic antigen induced arthritis: influence on T helper cell activation.
Clin Exp Immunol 135: 409-415, 2004
- Prakken ABJ, van Eden W, Rijkers GT, Kuis W, Toebes EA, de Graeff-Meeder ER, van der Zeen R, Zegers BJ. Autoreactivity to human heat shock protein 60 predicts disease remission in oligoarticular juvenile rheumatoid arthritis.
Arthritis Rheum 39: 1826-1832, 1996
- Prakken BJ, van der Zee R, Anderton SM, van Kooten PJ, Kuis W, van Eden W. Peptide-induced nasal tolerance for a mycobacterial heat shock protein 60 T cell epitope in rats suppresses both adjuvant arthritis and nonmicrobially induced experimental arthritis.
Proc Natl Acad Sci USA 94(7): 3284-3289, 1997
- Proft T, Arcus VL, Handley V, Baker EN, Fraser JD. Immunological and biochemical characterization of streptococcal pyrogenic exotoxin I and J (speI and speJ) from *Streptococcus pyogenes*.
J Immunol 166: 6711-6719, 2001
- Proft T, Fraser JD. Bacterial superantigens
J Immunol 133: 299-306, 2003
- Proft T, Sriskandan S, Yang L, Fraser JD. Superantigens and streptococcal toxic shock syndrome.
Emerging Infectious Diseases 9: 1211-1218, 2003
- Quinn A, Ward K, Fischetti V, Hemric M, Cunningham MW. Immunological relationship between the class I epitope of streptococcal M protein and myosin.
Infect Immun 66: 4418-4424, 1998
- Ritchlin C, Dwyer E, Bucala R, Winchester R. Sustained and distinctive pattern of gene activation in synovial fibroblasts and whole synovial tissue obtained from inflammatory synovitis.
Scand J Immunol 40: 292-298, 1994
- Robinson J, Kehoe MA. Group A streptococcal M proteins: virulence factors and protective antigens.
Immunol Today 13: 362-367, 1992
- Rödel J, Vogelsang H, Prager K, Hartmann M, Schmidt K-H, Straube E. Role of interferon-stimulated gene factor 3 γ and beta interferon in HLA class I enhancement in synovial fibroblasts upon infection with *Chlamydia trachomatis*.
Infect. Immun 70(11): 6140-6146, 2002

- Ronneld J, Lysholm J, Engstrom, Laurent A, Klareskog L, Heyman B. Local anti-type II collagen antibody production in rheumatoid arthritis synovial fluid. Evidence for an HLA-DR4-restricted IgG response. *Arthritis Rheum* 37: 1023-1029, 1994
- Roth S, Andrassy K, Schmidt K-H, Gunther E, Ritz E. Febrile lady with acute renal failure and desquamating erythema. *Am J Kidney Dis* 34(1): 150-154, 1999
- Roudier J, Rhodes G, Petersen J, Vaughan JH, Carson DA.. The Epstein-Barr virus glycoprotein, a molecular link between HLA-DR4, HLA-DR1 and rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol* 27: 367-371, 1988
- Ruof J, Hulsemann JL, Mittendorf T, Handelsmann S, von der Schulenburg JM, Zeidler H, Merkesdal S. Costs of rheumatoid arthritis in Germany: a micro-costing approach based on healthcare payer's data sources. *Ann Rheum Dis* 62(6): 544-549, 2003
- Russnak RH, Candido PM. Locus encoding a family of small heat shock genes in *Caenorhabditis elegans*: two genes duplicated to form a 34.8-kilobase inverted repeat. *Mol Cell Biol* 5: 1268-1278, 1985
- Ryan M, McCarthy L, Rappuoli R, Mahon BP, Mills KH. Th1 and Th2 responses to co-injected antigen: adjuvant action is associated with enhanced regulatory cytokine production and expression of the co-stimulatory molecules B7-1, B7-2 and CD28. *Int Immunol* 10(5): 651-662, 1998
- Schmidt K-H, Mann K, Cooney J, Kohler W. Multiple binding of type 3 streptococcal M protein to human fibrinogen, albumin and fibronectin. *FEMS Immunol Med. Microbiol* 7: 135-144, 1993
- Schmidt K-H, Gerlach D, Wollweber L, Reichardt W, Mann K-H, Ozegowski J-H, Fleischer B. Mitogenicity of M5-protein extracted from streptococcal cells is due to SPEC and the mitogenic factor MF *Infec Immun* 63: 4569-4575, 1995
- Schiffenbauer J, Johnson HM, Butfiloski E, Wegrzyn L, Soo JM. Staphylococcal enterotoxins can re-activate experimental allergic encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 8543-8546, 1993
- Schwab JH, Brown RR, Anderle SK, Schlievert PM. Superantigen can reactivate bacterial cell wall-induced arthritis. *J Immunol* 150(9): 4151-4159., 1993
- Seidel W, Pierer M, Hantzschel H. Internist's therapy of rheumatoid arthritis *Internist* 45(6): 693-705, 2004
- Senior BW, Anderson GA, Morley KD, Kerr MA. Evidence that patients with rheumatoid arthritis have asymptomatic noch-significant *Proteus mirabilis* bacteriuria more frequently then healthy controls. *J Infect* 38: 99-106, 1999
- Soos JM, Schiffenbauer J, Johnson HM. Treatment of PL/J mice with the superantigen, staphylococcal enterotoxin B, prevents development of experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 43: 39-43, 1993
- Srivastava PK, Maki RG. Stress-induced proteins in immune response to cancer. *Curr Top Microbiol Immunol* 167: 109-123, 1991
- Steiner G, Smolen JS. Neue Autoantikörper in der Diagnostik der rheumatoiden Arthritis. *Z Rheumatol* 61: 667-673, 2002

- Stephens RS, Kalman S, Lammel C, Fan J, Marathe R, Aravind L, Michell W, Olinger L, Tatusov RL, Zhao Q, Koonin EV, Davis RW. Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*.
Science 282: 754-759, 1998
- Ting JP, Baldwin AS. Regulation of MHC gene expression.
Curr. Opin. Immunol. 1: 8-16, 1993
- Tiwana H, Wilson C, Alvarez A, Abuknesha R, Bansal S, Ebringer A. Crossreactivity between the rheumatoid arthritis-associated motif EQKRAA and structurally related sequences found in *Proteus mirabilis*.
Infect Immun 67: 2769-2775, 1999
- Torres BA, Tanabe T, Yamamoto JK, Johnson HM. HIV encodes for its own CD4 T cell superantigen mitogen.
Biochem Biophys Res Commun 225: 672-678, 1996
- van Eden W, Thole JE, van der Zee R, Noordzij A, van Embden DJ, Hensen EJ, Cohen IR. Cloning of the mycobacterial epitope recognized by T lymphocytes in adjuvant arthritis.
Nature 331: 171-173, 1988
- van Eden W. Heat shock proteins as immunogenic bacterial antigens with the potential to induce and regulate autoimmune arthritis.
Immunol Rev 121: 1-27, 1991
- van de Merwe JP, Stefeman JH., Hazenberg MP. The resident faecal flora is determined by genetic characteristics of the host. Implications for Crohn's disease?
Anton Leeuw 49: 119- 124, 1983
- Villareal C, Whittum-Hudson JA, Hudson AP. Persistent Chlamydiae and chronic arthritis.
Arthritis Res 4: 5-9, 2002
- von Grunnigen R, Schneider CH. Epitope analysis: biotinylated short peptides as inhibitors of anti-peptide antibody.
J Immunol Methods 125: 143-146, 1989
- von Mikecz A, Konstantinov K, Buchenwald DS, Gerace L, Tan EM. High frequency of autoantibodies to insoluble cellular antigens in patients with chronic fatigue syndrome.
Arthritis Rheum 40: 295-305, 1997
- Vossenaar ER, Despres N, Lapointe E, Van Der Heijden A, Lora M, Senshu T, Van Venrooij WJ, Menard HA. Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin.
Arthritis Res Ther 6(2): 142-150. 2004
- Waldron-Lynch F, Adams C, Amos C, Zhu DK, McDermott MF, Shanahan F, Molloy MG, O'Gara F. Tumour necrosis factor 5' promoter single nucleotide polymorphisms influence susceptibility to rheumatoid arthritis (RA) in immunogenetically defined multiplex RA families.
Genes Immun 2(2): 82-87, 2001
- Watanabe-Ohnishi R, Aelion J, LeGros L, Tomai MA, Sokurenko EV, Newton D, Takahara J, Irino S, Rashed S, Kotb M. Characterization of unique human TCR V beta specificities for a family of streptococcal superantigens represented by rheumatogenic serotypes of M protein.
J Immunol 152(4): 2066-2073, 1994
- Weber H. (Hersg.) Wörterbuch der Mikrobiologie
Gustav Fischer Verlag Jena, 1997
- Welch W. How cells respond to stress.
Scientific American 268(5): 56-64, 1993

White J, Herman A, Pullen AM, Kubo RT, Kappler JW, Marrack P. The V β -specific superantigen staphylococcal enterotoxin B: stimulation of mature T cells and clonal deletion in neonatal mice. *Cell* 56: 27-35, 1989

Whitenack E, Dale JB, Beachey EH. Common protective antigens of group A streptococcal M proteins masked by fibrinogen. *J Exp Med* 159: 1201-1202, 1984

Wilkinson NZ, Kingsley GH, Jones HW, Sieper J, Braun, Ward ME. The detection of DNA from a range of bacterial species in the joints of patients with a variety of arthritides using a nested, broad-range polymerase chain reaction. *Rheumatol* 38: 260-266, 1999

Xue C, Takahashi M, Hassunuma T, Aono H, Yamamoto K, Yoshino S, Sumida T, Nishioka K. Characterisation of fibroblast-like cells in pannus lesions of patients with rheumatoid arthritis sharing properties of fibroblasts and chondrocytes. *Ann Rheum Dis* 56: 262–267, 1997

Yamada R, Tanaka T, Unoki M, Nagai T, Sawada T, Ohnishi Y, Tsunoda T, Yukioka M, Maeda A, Suzuki K, Tateishi H, Ochi T, Nakamura Y, Yamamoto K. Association between a single-nucleotide polymorphism in the promoter of the human interleukin-3 gene and rheumatoid arthritis in Japanese patients, and maximum-likelihood estimation of combinatorial effect that two genetic loci have on susceptibility to the disease. *Am J Hum Genet* 68(3): 674-685. 2001

Yarwood JM, Leung DY, Schlievert PM. Evidence for the involvement of bacterial superantigens in psoriasis, atopic dermatitis, and Kawasaki syndrome. *FEMS Microbiol Lett* 192(1): 1-7, 2000

Yi Y, Zhong G, Brunham RC. Continuous B-cell epitopes in *Chlamydia trachomatis* heat shock protein 60. *Infect Immun* 61(3): 1117-1120, 1993

Zanelli E., Gonzalez-Gay MA, David CS. Could HLA-DRB1 be the protective locus in rheumatoid arthritis? *Immunol Today* 16: 274-278, 1995

III Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt PD Dr. Karl-Hermann Schmidt für die Möglichkeit die interessante Fragestellung der vorliegenden Arbeit in seiner Arbeitsgruppe am Institut für Medizinische Mikrobiologie zu bearbeiten, ebenso wie für die gute Betreuung, ständige Diskussionsbereitschaft und zahlreiche Anregungen während der gesamten Zeit.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. Rolf Bräuer bedanken, ohne dessen fachliche Kompetenz, räumliche und technische Unterstützung die Durchführung der Tierversuche am Institut für Pathologie nicht realisierbar gewesen wären.

Auch bei den Mitarbeitern beider Arbeitsgruppen möchte ich für ein belebendes Arbeitsklima, zahlreiche Diskussionen und die Unterstützung bei experimentellen Arbeiten bedanken. Ein besonderer Dank geht hierbei an Dr. Marion Hückel, Svea Sachse, Stefan Rödiger, Renate Stöckigt und Cornelia Hüttich.

Dr. Mieczyslaw Gajda vom Institut für Pathologie danke ich für die Auswertung der histologischen Präparate.

Bei Dr. Jürgen Rödel möchte ich mich für die wertvollen Diskussionen zum Thema Chlamydien bedanken.

Meiner Familie möchte ich ebenso wie meinen Freunden für ihr Verständnis und ihre Unterstützung in allen Lebenslagen meinen tiefsten Dank aussprechen.

Besonders bei meiner Mutter und Ulf Bernhardt möchte ich mich für Ihre unendliche Geduld und Liebe bedanken.

IV Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Jena, den 06. Dezember 2004

Regine Wagner

V Curriculum Vitae

Regine Wagner

Persönliche Daten

Geburtsdatum	08. August 1976
Geburtsort	Wolfen, Deutschland

Schulbildung

1983 – 1991	8. Polytechnische Oberschule Dessau
1991 – 1995	Europagymnasium Dessau

Studium

1995– 1996	Raritan Valley Community College, NJ USA Kurse in Weltgeschichte und Anthropologie
1996 – 1998	Grundstudium Biologie an der Georg-August-Universität Göttingen
1998 – 2001	Hauptstudium Biologie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena Schwerpunkt Mikrobiologie / Medizinische Mikrobiologie
2000 – 2001	Diplomarbeit im Department of Biomedical Chemistry and Microbiology der Uppsala University, Schweden Thema: „ASF/SF2 hypophosphorylation during an adenovirus infection; effects on protein interaction and splicing“
2002 – 2004	Anfertigung der Doktorarbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Friedrich-Schiller- Universität Jena Thema: „Bakterieller Einfluss auf Autoimmunreaktionen bei Rheumatoider Arthritis: Suche nach kreuzreaktiven Antikörpern und Beitrag von Superantigenen bei induzierter Arthritis in der Maus“